

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

*FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI*

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE



Dottorato di Biologia Avanzata XXII ciclo

*Studio in vivo degli effetti degli Alchilfenoli sulla ghiandola
adrenale e sulla ghiandola tiroide della lucertola Podarcis
sicula, organismo bioindicatore.*

Tutor:

Dottoranda:

Prof.ssa

Vincenza Laforgia

Ch.ma

Dott.ssa

Anna Sellitti

Cotutor:

Ch.mo Prof.re

Gaetano Ciarcia

Coordinatore Ch.mo Prof.re Luciano Gaudio

INDICE

INTRODUZIONE

I CAPITOLO

BIOINDICATORI E BIOMARKERS *pag 11*

II CAPITOLO

I FENOLI *pag 15*

III CAPITOLO

Effetti degli alchilfenoli *pag 20*
NP, OP e BPA.

IV CAPITOLO

SCOPO DELLA RICERCA *pag 36*

V CAPITOLO

MATERIALI E METODI pag 39

I Trattamento in *vivo*: NP

II Trattamento in *vivo*: OP

III Trattamento in *vivo*: NP+OP

Indagini morfologiche

Indagini radioimmunologiche

VI CAPITOLO

RISULTATI pag 57

I Trattamento in *vivo*: NP

Ghiandola surrenale

Ghiandola tiroidea

II Trattamento in *vivo*: OP

Ghiandola surrenale

Ghiandola tiroidea

III Trattamento in vivo: NP+OP

Ghiandola surrenale

Ghiandola tiroidea

VII CAPITOLO

DISCUSSIONI *pag 86*

VIII CAPITOLO

TAVOLE *pag 92*

I Trattamento in vivo: NP

Ghiandola surrenale

Ghiandola tiroidea

II Trattamento in vivo: OP

Ghiandola surrenale

Ghiandola tiroidea

III Trattamento in vivo:NP+OP

Ghiandola surrenale

Ghiandola tiroidea

IX CAPITOLO

BIBLIOGRAFIA pag 115

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di tecnologie industriali ed un comportamento di tipo degradativo hanno condotto ad un continuo rilascio nell'ambiente di inquinanti, tra i quali moltissime sostanze mutagene e dannose per la salute umana. La Commissione Europea e gli organismi internazionali preposti al controllo delle condizioni di salute ambientale hanno messo in evidenza le gravi conseguenze che un eterogeneo gruppo di sostanze indicate come EDC (Endocrine Disrupting Chemicals) può avere, anche a concentrazioni bassissime, sul sistema endocrino, in particolare sull'omeostasi degli ormoni sessuali e sullo sviluppo.

La definizione di una sostanza come EDC è stata riportata in un documento dell'EPA (Environmental Protection Agency) nel rapporto speciale del 1997: "Una qualsiasi sostanza esogena che è in grado di interferire con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali di un organismo, responsabili del mantenimento dell'omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo" (Menditto et al. 1997). In particolare il distruttore endocrino presente nell'ambiente, una volta entrato

nell'organismo, può interagire con il sistema endocrino secondo una serie di meccanismi quali:

- Imitare l'azione svolta da un ormone estrogeno;
- Legarsi ad altri tipi di recettori, interferendo con la normale azione ormonale;
- Modificare il numero di recettori ormonali di una cellula bersaglio;
- Modificare il metabolismo degli ormoni.

I distruttori endocrini sono agenti che producono effetti biologici reversibili o irreversibili in individui o popolazioni, interferendo con la normale funzione ormonale (Regoli 2002).

Tali sostanze possono anche essere capaci di mimare l'effetto degli ormoni steroidei sul controllo retroattivo del cervello, dell'ipofisi, delle gonadi, della tiroide, delle ghiandole surrenali e di altri organi (Guillette et al. 2001). L'enorme quantità di composti che sono in grado di interferire con il sistema endocrino animale ed umano rende difficile anche la loro classificazione.

Il sistema endocrino è infatti molto complesso e può essere perturbato da molti fattori chimici esogeni che possono essere antagonisti o agonisti di recettori, stimolatori o inibitori della sintesi o del metabolismo indotto da ormoni.

Spesso gli effetti sul sistema endocrino si manifestano a dosi molto basse che generalmente non determinano effetti tossici evidenti (Riganti et al. 2003), ciò rende ancora più pericolose svariate sostanze che non hanno un effetto tossico manifesto e che non sono ancora state inserite nella categoria dei distruttori endocrini.

Gli effetti su animali a sangue caldo o sull'uomo possono essere di 3 tipi:

- mutageni, se producono alterazioni nel patrimonio genetico;
- cancerogeni, quando si producono dei ceppi anomali di cellule;
- teratogeni, quando le alterazioni riguardano gli embrioni o il feto.

Tali effetti sono di difficile determinazione perché si manifestano molto tempo dopo che ha avuto luogo il processo di malformazione.

In via generale gli EDCs possono essere classificati in cinque categorie principali:

- Farmaci o estrogeni sintetici (come il 17β -estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo, DES);
- Fitoestrogeni, vari composti sintetizzati dalle piante tra cui soia, frumento, etc;
- Pesticidi (organo fosforici, carbammati, etc);

- Plastificanti (in particolare ftalati) e prodotti derivati dalla combustione del PVC (policloruro di vinile), ma anche della carta e delle sostanze putrescibili come le diossine;

- Sostanze di origine industriale come fenoli, ritardanti di fiamma, acido perfluorooctanico e suoi sali; metalli pesanti come piombo, cadmio, mercurio.

I distruttori endocrini hanno carattere lipofilo e questo permette loro di diffondere attraverso la membrana cellulare, di legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei e di accumularsi a livello del tessuto adiposo (Riganti et al. 2003).

Il loro bioaccumulo ha sicuramente una notevole importanza dal punto di vista tossicologico, anche se bisogna considerare che tale fenomeno non è riconducibile solo all'inquinamento ambientale, ma può verificarsi anche attraverso la via alimentare (Daland, 1999).

E' stato da tempo dimostrato che molte sostanze chimiche ambientali hanno la capacità di interferire con funzioni correlate con il sistema neuroendocrino e molti dei distruttori endocrini presenti nell'ambiente acquatico hanno attività estrogeniche responsabili dei processi di femminilizzazione in anfibi e pesci. In tutti i vertebrati, gli effetti estrogenici di composti dannosi sono mediati dal

loro legame al recettore dell'estrogeno in cellule bersaglio che promuove un pattern di espressione di geni estrogeno-specifici.

Gli effetti degli EDCs sono stati dimostrati in diversi taxa, nei quali sono stati osservati effetti sulla differenziazione sessuale, decrementi della fertilità e riduzioni del tasso di accrescimento (Colborn 1992; Harrison 1997).

Si è giunti alla consapevolezza dell'esistenza di un potenziale rischio per l'uomo e più in generale per gli organismi viventi.

I CAPITOLO

BIOINDICATORI E BIOMARKERS

Alla base di una corretta valutazione del rischio ambientale nei confronti di determinati contaminanti, vi è la scelta di una giusta specie di riferimento. Un bioindicatore è, appunto, un organismo che dà informazioni sulle condizioni ambientali di un determinato habitat, attraverso la sua presenza, assenza o il suo comportamento.

Tra i vari organismi è stato visto che i rettili sono una specie storicamente utilizzata come “bioindicatori” per l’ampia diffusione nei vari habitat, con una distribuzione geografica vasta e lunga nel tempo e con una stabilità dei luoghi in cui vivono che consente di trovare gli esemplari rapidamente (Hall et al. 82). Inoltre sono in grado di bioaccumulare e biomagnificare in modo uguale se non maggiore rispetto ad uccelli e mammiferi (Fossi et al. 94). In passato sono stati adoperati per studiare gli effetti dei metalli pesanti, di recente per i distruttori endocrini.

Il concetto di biomonitoraggio è in continua evoluzione e dall’approccio iniziale esclusivamente chimico (anche se condotto sugli organismi), si sta oggi passando ad una visione più ampia del problema, in cui risulta

fondamentale l'integrazione dei dati chimici con una valutazione degli effetti biologici. La volontà di sviluppare metodi di biomonitoraggio sempre più efficaci ha portato la ricerca verso lo studio di nuovi indicatori biologici, i biomarcatori. La National Academy of Science definisce biomarker “quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari, che può essere misurata in un sistema biologico” (1989). Il concetto si è evoluto e oggi può essere definito come “la variazione di una risposta biologica (biochimica, molecolare, cellulare, fisiologica o comportamentale) che può essere correlata all'esposizione e/o all'effetto tossico di composti inquinanti” (Peakal et al. 1994).

La caratterizzazione dei biomarkers ed il loro corretto utilizzo, si basa essenzialmente sulla conoscenza degli effetti indotti a livello cellulare e molecolare da molte classi di contaminanti negli organismi viventi, effetti che possono andare dall'attivazione di specifici meccanismi di detossificazione, all'insorgenza di diverse alterazioni che possono essere utili per indicare l'esposizione ad una sostanza tossica o possono essere l'espressione di tossicità.

Sulla base di queste caratteristiche, i biomarkers possono essere distinti in:

a) biomarkers di effetto, che consistono in misurazioni di alterazioni biochimiche e fisiologiche di cellule, tessuti e fluidi corporei che possono essere associate ad un danno ed evidenziano l'insorgenza di effetti negativi e/o tossici indotti dall'esposizione alle sostanze inquinanti, rappresentando quindi uno strumento importante anche per valutare i rischi connessi alla tutela della salute pubblica.

Un esempio caratteristico può essere quello della acetilcolinesterasi (AChE);

b) biomarkers di esposizione, che consistono nella rilevazione di una sostanza esogena, dei suoi metaboliti o prodotti di interazione con molecole bersaglio o cellule e che non sempre riflettono una compromissione dello stato di salute di un organismo (Bartkowiak et al 95). Le colinesterasi del sangue come ad esempio la butirilcolinesterasi (BChE) e la carbossicolinesterasi (CbhE), rappresentano due dei biomarkers di esposizione più utilizzati;

c) biomarkers di suscettibilità, che indicano l'innata capacità di un organismo di opporsi all'effetto del contaminante mediante meccanismi diversi che includono fattori genetici e modificazioni della risposta recettoriale (Ron Van Der Oost et al 2003).

A seconda poi che un biomarker sia anche in grado di fornire indicazioni precise su quale classe di contaminanti chimici abbia indotto l'alterazione misurata si parla di biomarkers "specifici" o "generali" (Ron Van Der Oost et al. 2003).

Gli effetti ormonali di svariati contaminanti consentono di adoperare l'alterazione nella concentrazione di vitellogenina, testosterone, estrogeni come biomarkers in tutte le specie di vertebrati. Molti sono i biomarkers che potrebbero essere citati ma nonostante ciò, la ricerca di nuovi e più sensibili biomarkers è sempre più sviluppata dal momento che essi possono rappresentare degli indici precoci di tossicità che si modificano prima che si verifichino danni irreparabili a livello cellulare e tissutale.

II CAPITOLO

I FENOLI

I fenoli sono EDCs molto diffusi in natura, si tratta di composti organici che recano un gruppo ossidrilico direttamente legato ad un anello aromatico. Tali composti servono come intermedi nella sintesi industriale di prodotti che vanno dagli antisettici ai collants.

Tra i fenoli esplicano attività estrogenica, in particolare, il bisfenolo e gli alchilfenoli (AP), composti fenolici con catene alchiliche di varia lunghezza.

Gli alchilfenoli rappresentano una delle categorie più importanti di EDC, si formano nell'ambiente o negli impianti di trattamento delle acque reflue per degradazione dei rispettivi polietossilati, composti largamente utilizzati come tensioattivi in numerose formulazioni chimiche.

Gli AP hanno in genere elevati fattori di bioconcentrazione (BCF) e si accumulano nei sedimenti e negli organismi acquatici.

Essi sono sostanze chimiche non alogenate usate quasi esclusivamente per produrre gli alchilfenoli etossilati (APE), un gruppo di tensioattivi non ionici. Questi ultimi sono ottenuti per condensazione dell'ossido di etilene o di propilene con un alchilfenolo (come ad esempio i

nonilfenoli) e presentano ottime proprietà emulsionanti e detergenti; per tale ragione sono impiegati come disperdenti nella formulazione di pesticidi ad uso agricolo e domestico e come emulsionanti in diversi prodotti per l'igiene e l'uso personale (Naylor 1995; Tyl et al. 1999).

Analisi congiunte delle acque e dei fanghi hanno evidenziato la presenza di composti fenolici ed un loro rilascio nell'ambiente circostante (Ahel et al. 1994b).

Una volta rilasciati nell'ambiente, gli APE in particolare possono essere nuovamente degradati in AP, caratterizzati dal fatto di essere più tossici e meno biodegradabili dei composti da cui si originano.

Gli alchilfenoli, essendo caratterizzati da buone proprietà antiossidanti, vengono impiegati anche nella produzione delle plastiche trasparenti utilizzate nell'industria alimentare al fine di ritardare l'ingiallimento o l'opacamento; pertanto, le bevande e gli alimenti che ne vengono a contatto possono risultare contaminati (Inoue et al. 2001).

Gli AP, in genere, presentano una bassa tossicità in seguito ad esposizione prolungata per via orale, ma presentano attività estrogenica con caratteristiche tessuto specifiche.

Il nonilfenolo (NP) è il composto commercialmente più importante tra gli alchilfenoli ed è prodotto

industrialmente attraverso una reazione di alchilazione, acido catalizzata, del fenolo con una miscela di isomeri del nonene.

La molecola è costituita da un anello fenolico e una catena alchilica, in posizione para, composta da nove atomi di carbonio che può essere più o meno ramificata. Con il termine nonilfenolo perciò ci si riferisce in genere ad una miscela di isomeri di peso molecolare compreso tra 215 e 220 g/mol (Fig. 1 a).

Il 4-nonilfenolo è un prodotto di degradazione degli alchilfenoli, utilizzato in primis come agente tensioattivo nell'industria (Nimrod et al. 1996 a, b), la cui tossicità è dovuta alla sua capacità di persistere accumulandosi nelle acque e nei sedimenti e di bioaccumularsi nei tessuti degli organismi acquatici, a causa della sua natura lipofila. Tale caratteristica, inoltre, ne determina un accumulo progressivo nella catena alimentare.

Per quel che riguarda l'octilfenolo (OP), si tratta di un fenolo che differisce per struttura chimica dal NP in quanto caratterizzato da otto atomi di carbonio (Fig. 1 b).

L'octilfenolo è un prodotto primario di ripartizione degli alchilfenoli (come NP), e rappresenta una delle più comuni sostanze chimiche grazie al suo largo impiego come diluente di pesticidi e come componente di molti prodotti commerciali utili, incluse vernici, shampoo,

inchiostro, e cosmetici (Ying et al. 2002).

L'attività estrogenica di OP è stata dimostrata sia in colture cellulari (White et al. 1994), che in studi che hanno evidenziato la competizione con i fitoestrogeni per i recettori ER α e ER β (recettori per gli estrogeni) umani (Kuiper et al. 1998).

L'OP viene utilizzato da solo o in combinazione con il nonilfenolo nella formulazione di materiale plastico, di detergenti e detersivi. Inoltre è un fattore determinante (da solo e/o con gli altri AP) per il processo di femminilizzazione dei pesci e per tale motivo risulta presente in vari prodotti ittici.

Nei prodotti ittici, però, le concentrazioni di OP riportate sono sempre risultate notevolmente inferiori di quelle del NP, probabilmente a causa della minore emissione di octilfenolo-etossilati (Ferrara et al. 2008)

PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE NONILFENOLO	
Formula molecolare	$C_{15}H_{24}O$
Punto di ebollizione	290-302°C
Punto di fusione	-8°C
Densità relativa	0,95(a 20°C)

PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE OCTILFENOLO	
Formula molecolare	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_9$
Punto di ebollizione	$\geq 210^\circ C$
Punto di fusione	-6°C
Densità relativa	1,07

Figg.1 a-b: Tabelle delle proprietà chimico-fisiche

Nonilfenolo , Octilfenolo

III CAPITOLO

Gli Effetti Degli Alchilfenoli NP, OP e BPA

I primi studi relativi agli alchilfenoli risalgono al 1978 quando Mueller e Kim dimostrarono che tali sostanze sono in grado di legarsi ai recettori per gli estrogeni; i risultati di tale lavoro furono però messi da parte fino al 1991, quando Soto et al. scoprirono che il 4-NP lisciviato da materiale plastico, si comportava come un debole estrogeno.

L'estrogenicità del 4-NP è dovuta alla sua abilità di legarsi al recettore E2 (ER) e di modulare la sintesi di proteine estrogeno-responsive, inclusa la proteina vitellogenina epatica (VTG), precursore delle proteine del tuorlo e delle proteine del guscio (Zrp, proteina della zona radiata).

Il 4-NP è in grado di esplicare la sua attività estrogenica a basse concentrazioni come dimostrato da vari studi, da quelli condotti nel 1995 nei fiumi dell'UK in cui è stato rilevato un valore di 4-NP pari a 10µg/L, a quelli eseguiti sui pesci da Jobling nel 1996, lavoro da cui è emerso che concentrazioni di 4-NP più basse rispetto a quelle rilevate nel precedente studio sono in grado comunque di indurre l'attività estrogenica.

Nonostante esempi di distruzione endocrina siano stati osservati in tutte le classi di vertebrati, pesci ed anfibi, a causa del loro stile di vita acquatico, sono maggiormente esposti agli effetti degli EDCs. Sono stati effettuati, infatti, numerosi studi su maschi di rane e tritoni allo scopo di valutare gli effetti estrogenizzanti del 4-NP, utilizzando come biomarkers i cambiamenti della vitellogenina; in particolare sono stati eseguiti dosaggi ormonali per quantizzare il livello di ormoni steroidei sessuali nel sangue (Polzonetti Magni et al. 2004).

Sono stati eseguiti trattamenti *in vitro* ed *in vivo* con 4-NP e 17 β -estradiolo ed i risultati ottenuti hanno mostrato un aumento nel plasma della concentrazione di vitellogenina, androgeni ed estradiolo.

Di grande interesse inoltre sono alcuni lavori di recente pubblicazione che si sono soffermati sull'effetto degli EDCs negli organismi acquatici utilizzando i microarray. Uno dei maggiori vantaggi di questa tecnica, infatti, è la possibilità di rilevare la presenza di sostanze anche a basse concentrazioni. Nello specifico tale tecnica è stata utilizzata per lo sviluppo di un test per il monitoraggio dell'inquinamento ambientale da EDCs, scegliendo il monitoraggio di geni regolati da sostanze estrogeniche. Recentemente Kim e collaboratori (2006), grazie ad un microarray di 3400 sonde, sono riusciti a rilevare un

cambiamento di espressione genica nel fegato di *medaka*, causato dal 4-NP; specificamente, alcuni geni erano modulati sia dal trattamento che dalla concentrazione di 4-NP utilizzata (Kim et al. 2006).

Da studi condotti a New York City e nel New Jersey è emerso che il nonilfenolo deve essere considerato anche una sostanza inquinante presente nell'aria ed è stato ipotizzato che la sua presenza sia dovuta ad un'evaporazione del NP dal fiume Hudson e dai piccoli fiumi delle regioni vicine che abitualmente ricevono le acque di scarico municipali. Inoltre, è stata riscontrata anche la presenza del nonilfenolo nel latte, determinato probabilmente dal suo rilascio dal materiale usato per l'imballaggio (Paulozzi, 1999).

Dal momento che le informazioni riguardo gli effetti degli EDCs, in particolare del NP, sugli esseri umani sono molto scarse, sono stati eseguiti studi anche su organismi terrestri. In particolare sono stati utilizzati topi ICR di sesso femminile (Kimura et al. 2006), per valutare l'effetto dell'esposizione gestazionale al NP sullo sviluppo e sulla fertilità della prole. Tale studio è stato condotto *in utero* somministrando ai topi ICR, mediante iniezioni sottocutanee giornaliere, diverse concentrazioni di nonilfenolo in relazione alla dose letale media (LD50), valutata precedentemente. E' stato evidenziato che la

somministrazione di NP alle madri durante il periodo compreso dagli 11 ai 18 giorni di gestazione, provoca nella prole maschile una riduzione dose-dipendente del peso dell'epididimo destro (Hoissani et al. 2001).

Tale riduzione, nei topi, implica una diminuzione della densità dello sperma epididimale (De Jager et al.1999; Chapin et al.1999; Han et al. 2004). Inoltre Lee (1998) ha riportato che l'esposizione neonatale al NP (20.8 mg/kg/giorno),mediante iniezioni intraperitoneali ritarda lo sviluppo degli organi riproduttivi.

Di poi, in seguito a reazione TUNEL, è stato messo in evidenza che il nonilfenolo induce apoptosi nei tubuli seminiferi dei ratti Sprague-Dawley (SD- adulti) e sono stati anche osservati danni all'acrosoma negli spermatozoi di topo, danni alle cellule del Sertoli ed ispessimento dell'epitelio seminifero nella generazione F1(Han et al. 2004).

Nonostante i risultati ottenuti riguardo alla spermatogenesi, si è visto che l'esposizione in utero al NP durante la gestazione non influenza la potenziale fertilità nella generazione F1, il numero di feti o la lunghezza del periodo gestazionale.

L'octilfenolo come il nonilfenolo ha evidenti effetti tossici dimostrati in primis su colture di cellule spermatogeniche e cellule di Sertoli isolate da ratti (Raychoudhury et al.,

1999) e su cellule tumorali di Leydig (mLTC-1)(Nikula et al., 1999).

Inoltre, molti studi *in vitro* su cellule di Leydig a diversi fasi di sviluppo hanno mostrato che OP è in grado di determinare un cambiamento delle loro capacità steroidogeniche (Murolo et al., 2000, 2001).

Tale dato è significativo in quanto la cellula di Leydig del testicolo ha la capacità di sintetizzare testosterone a partire dal colesterolo (Payne e Youngblood, 1995) e tale biosintesi dipende da vari enzimi steroidei.

Le cellule di Leydig, inoltre, esprimono anche l'aromatasi P450, che catalizza l'aromatizzazione del testosterone ad estradiolo (Payne e Youngblood, 1995), ed il fattore steroideo 1 (SF-1), che svolge un ruolo importante nel mediare la trascrizione.

Precedenti studi (Sharpe et al., 1995) hanno dimostrato che l'esposizione del feto di sesso maschile o del neonato (in via di sviluppo) a sostanze chimiche estrogeniche si traduce in una riduzione della dimensione dei testicoli e della produzione di spermatozoi durante la vita adulta. Successivamente è stato dimostrato che l'esposizione cronica a OP di ratti adulti determina una riduzione della produzione di testosterone e perturba la spermatogenesi (Blake e Boockfor, 1997; Boockfor e Blake, 1997). Da tali studi risulta evidente che gli effetti dell'esposizione ad OP

sono dovuti al fatto che la differenziazione delle cellule di Leydig avviene durante la fase giovanile ed è fondamentale per la produzione di testosterone in fase adulta.

Recentemente, Suel-Kee Kim e collaboratori (2007) hanno approfondito gli effetti dell'OP sulla steroidogenesi e sulla produzione di testosterone da parte del testicolo, durante due fasi diverse di sviluppo del topo. Specificamente, topi maschi sono stati esposti ad OP a 15 giorni dopo la nascita (stadio giovanile) e ad 8 settimane di età (stadio adulto).

Inoltre per chiarire se le variazioni nella produzione di testosterone coincidono con le alterazioni di espressione dei geni degli enzimi steroidei a livello testicolare, sono state prese in esame le variazioni dell'espressione genica di tali enzimi e studiati i loro fattori di trascrizione(Payne and Youngblood 1995). In particolare i risultati ottenuti indicano che l'esposizione ad OP durante lo stadio giovanile diminuisce l'espressione trascrizionale degli enzimi steroidei e la differenziazione delle cellule di Leydig, e, di conseguenza, la diminuzione della sintesi di testosterone .

Sono state studiate anche le variazioni del contenuto lipidico nelle cellule di Leydig dopo l'esposizione a OP,

dimostrando una diminuzione del contenuto di lipidi nelle cellule di Leydig.

Inoltre è stata osservata una ridotta espressione trascrizionale del gene STAR (gene responsabile del trasporto del colesterolo), evidenziando che l'alterato metabolismo del colesterolo e/o del suo trasporto possono rappresentare un meccanismo potenziale per diminuire la produzione di testosterone in seguito all'esposizione all'octilfenolo.

Tale lavoro suggerisce che l'esposizione a questa sostanza durante i periodi critici dello sviluppo può provocare effetti più gravi che durante l'esposizione allo stadio adulto.

Quindi l'octilfenolo va ad incidere negativamente sul normale sviluppo testicolare e sulla spermatogenesi in quanto agisce in modo differenziale sulle due diverse età di sviluppo con effetti più accentuati e significativi sullo sviluppo e la differenziazione delle cellule di Leydig (Kim et al 2007).

E' di notevole importanza però considerare che la tossicità degli AP, in generale, non ha come bersaglio unicamente gli organi riproduttivi.

Infatti, in uno studio multigenerazionale effettuato su ratti Sprague-Dawley, Chapin et al. (1999) hanno evidenziato che, in seguito all'esposizione attraverso la

dieta di quantità di NP superiori a 200 ppm (approssimativamente 20 mg/kg/dose), si sono riscontrate alterazioni a livello renale tra cui aumento del peso di tali organi, dilatazione dei tubuli e formazione di cisti isolate. Inoltre si è visto che l'esposizione alimentare cronica a dosi di NP fino a 2000 ppm dal 7° giorno di gestazione fino al 50° giorno postnatale ha una significativa incidenza nella malattia policistica renale (PKD) poichè il 100% degli animali di entrambi i sessi risulta severamente affetto da tale patologia dopo esposizione ad alte dosi di NP (Latendresse et al. 2001)

Di grande interesse è anche un lavoro di recente pubblicazione (Aydogan et al. 2008) riguardante i danni al cervello di ratti maschi in seguito ad esposizione con Bisfenolo A (BPA), NP e OP.

In particolare con tale lavoro è stata studiata la capacità di tali sostanze, singolarmente e/o in combinazione tra loro, di indurre stress ossidativo a livello del tessuto cerebrale e se la combinazione orale con la vitamina C potesse impedire il più possibile lo stress ossidativo.

Da tale trattamento è emerso che non vi sono state significative variazioni del peso dell'organo rispetto al controllo, fatta eccezione per gli animali trattati solo con OP, per i quali si è registrato un aumento considerevole di peso dell'organo. Sono stati presi in esame anche i

livelli di glutathione ridotto (GSH), in quanto potente antiossidante, il quale è risultato essere presente a livelli elevati cervelli nel cervello di ratti trattati con BPA, NP e OP. Al contrario, (malonildialdeide) l'MDA, altra molecola chiave in quanto prodotto di perossidazione dei lipidi, risulta espresso solo in seguito ad esposizione ad elevate concentrazioni della miscela BPA e NP e negli animali trattati solo con OP. Da tale studio emerge che OP presenta una tossicità maggiore rispetto alle altre due sostanze testate (Aydogan et al. 2008).

Inoltre, l'esame istopatologico ha messo in evidenza che la somministrazione di vitamina C comporta un ipercromaticità delle cellule a livello della corteccia cerebrale, non riscontrabile nel cervello di ratti trattati solo con BPA, BPA, NP ed OP. I risultati di tale studio quindi dimostrano che BPA, NP ed OP, BPA generano le specie reattive dell'ossigeno responsabili dello stress (DANNO) ossidativo a carico del cervello degli animali trattati, in più la combinazione orale della vitamina C sembra aggravare tale danno (Aydogan et al. 2008).

Recentemente, Liu e collaboratori (2007), hanno condotto studi *in vitro* su cellule cromaffini adrenali bovine per valutare gli effetti del NP sulla secrezione di catecolammine indotta dall'attivazione dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs). L'NP, infatti, è noto

oltre che per la sua attività estrogenica anche come inibitore della Ca-ATPasi del reticolo endoplasmatico (RE) (Michelangeli et al.1990). La Ca-ATPasi può modulare la concentrazione citosolica di calcio un importante secondo messaggero coinvolto nell'attività funzionale di molti recettori tra cui i recettori nAChRs.

In tale studio, per stimolare gli nAChRs, è stato usato il DMPP (1,1 dimethyl-4 phenyl-piperazinium iodide), il quale determina un aumento transitorio della concentrazione citosolica di calcio con un conseguente rilascio di adrenalina e noradrenalina. In presenza di tale sostanza, il nonilfenolo sopprime completamente l'aumento della concentrazione di calcio citosolica e parzialmente il rilascio delle catecolamine indotti dal DMPP. È stato infatti dimostrato che il Nonilfenolo è in grado di aumentare la secrezione basale di adrenalina e noradrenalina in maniera dose dipendente.

Degno di nota è anche uno studio eseguito su organi del sistema immunitario ed organi del sistema endocrino di embrioni di quaglie riguardo gli effetti del 17-beta estradiolo e del nonilfenolo (Razia et al. 2006).

In particolare tale studio è stato eseguito trattando le uova di quaglia con iniezioni, dal terzo al quindicesimo giorno di incubazione, a concentrazioni diverse di 17- β -estradiolo (E2) ed NP.

Il trattamento con E2 ha determinato a livello degli organi immunitari la scomparsa delle cellule linfoidi, l'appiattimento delle pliche della borsa di Fabrizio, mentre a livello del sistema endocrino è stata registrata una riduzione dell'area dei follicoli tiroidei e dell'altezza delle cellule dell'epitelio cubico semplice nella tiroide, un aumento follicolare a livello del timo e lo svilupparsi dell'ovotestis in embrioni maschili.

Per quel che riguarda invece il trattamento con NP, quest'ultimo non ha indotto né l'appiattimento delle pliche della borsa di Fabrizio né lo svilupparsi dell'ovotestis in embrioni maschili, ma tale trattamento ha determinato invece la scomparsa delle cellule linfoidi e la riduzione dell'altezza delle cellule dell'epitelio cubico semplice nella tiroide.

Il confronto di tali risultati ha confermato l'effetto estrogenico del nonilfenolo effetto che risulta però irrisorio rispetto a quello degli estrogeni.

Attraverso uno studio svolto da Ghisari (2004) si è osservato che l'esposizione a diverse classi di EDCs come plastificanti (BPA), alchilfenoli (NP, OP), pesticidi (prochloraz, iprodion), metaboliti del PCB e ritardanti di fiamma (TBBPA) altera le funzioni degli ormoni tiroidei (TH) e lo sviluppo del cervello nei ratti.

Il potere dei vari distruttori endocrini è stato determinato attraverso i loro effetti sulla proliferazione della linea cellulare ipofisaria GH3-TH dipendente. In particolare è stato evidenziato che gli EDCs interferiscono con la proliferazione di tali cellule singolarmente o in seguito a co-trattamento con l'ormone tiroideo T3. La crescita delle cellule GH3 è stimolata da tutte le sostanze chimiche testate tranne che da NP, OP, prochloraz e ipodrion che, al contrario, determinano un effetto inibitorio sulla crescita delle cellule ipofisarie.

In letteratura sono presenti una serie di studi che suggeriscono che alcuni degli effetti neurocomportamentali degli xenoestrogeni, come BPA, non possono essere determinati unicamente dalla loro azione estrogenica relativa al legame con i recettori nucleari ER alfa e beta (Wetherill *et al.*, 2007).

Molti xenoestrogeni tra cui NP, sono in grado di attivare, nella linea cellulare tumorale pituitaria GH3/B6/F10, la proteina chinasi ERK (Extracellular Regulated Kinase), la cui espressione è indotta da livelli elevati di recettori di membrana per ER- α (mER). I composti testati, eccetto il BPA, producono tutti una fosforilazione di ERK-1/2 rapida e concentrazione-dipendente ma attraverso differenti patterns di attivazione. Per identificare i pathways coinvolti nell'attivazione di ERK sono stati

utilizzati specifici inibitori dei recettori ERs, dei recettori per il fattore di crescita epidermico (EGF), delle vie di segnalazione del calcio, oltre ad un agente che provoca la rottura della membrana .

L'utilizzo contemporaneo di tali inibitori ha evidenziato la loro capacità di bloccare l'attivazione di ERK, suggerendo l'esistenza di pathways multipli e di complesse interazioni attraverso una rete di segnali intracellulari.

Al fine di chiarire ulteriormente l'effetto tossico degli AP ed in modo particolare del nonilfenolo, in seguito all'ingestione di cibi contaminati, all'assorbimento cutaneo e/o inalazione, sono stati eseguiti vari studi su campioni di popolazione di zone "metropolitane" come ad esempio lo studio condotto su operai del Nord della Cina (Chen et al. 2008). Tale studio ha messo in evidenza una elevata concentrazione di NP nel plasma degli individui analizzati, a conferma di un elevato grado di esposizione e contaminazione presente nell'ambiente "metropolitano". Tra gli studi condotti sull'uomo, molto importante è un lavoro condotto su donne in gravidanza abitanti delle zone metropolitane della Cina orientale (Taiwan) esposte per via alimentare ed ambientale al NP . Specificamente, sono state prese in esame circa 40 donne in gravidanza nelle quali è stato valutato il livello di NP presente nel plasma materno e fetale, oltre alle concentrazioni di NP

nel sangue venoso ed arterioso del cordone ombelicale. I risultati ottenuti sono stati sorprendenti in quanto hanno evidenziato elevate concentrazioni di NP non solo nel plasma materno ma anche in quello fetale, fetale indicando che tale sostanza è in grado di attraversare la barriera materno-fetale, dato confermato dalla presenza di NP a livello del cordone ombelicale (Chen et al. 2008).

Si è concluso, dunque, che l'assorbimento trans-placentale tale consente l'esposizione a livello fetale.

Per approfondire gli studi sulle vie di esposizione alimentari, Ademollo e collaboratori (2008) hanno eseguito uno studio per valutare la presenza di alchilfenoli nel latte materno di donne italiane ed i possibili effetti dannosi. Tale lavoro ha evidenziato la presenza nel latte materno di NP, OP, monoetossilati del nonilfenolo (NP1EO), e di OP1EO e OP2EO, due etossilati dell'octilfenolo (OPEOs).

L'agente inquinante presente a livelli maggiori è stato il NP, delle presente a concentrazioni medie di 32 ng/mL, circa due ordini di grandezza in più rispetto a OP (0.08 ng/mL), a OP1EO (0.07 ng/mL) e a OP2EO (0.16 ng/mL) (Ademollo et al. 2008).

La differenza osservata fra le concentrazioni di NP e quelle degli altri alchilfenoli analizzati nei campioni di latte materno può essere spiegata dal fatto che è di gran

lunga l'alchilfenolo più importante nel mercato attuale (centro di ricerca europeo della Commissione-Giunto et al, 2002)._

Effettivamente, è stato riscontrato ad alti livelli nell'ambiente, negli organismi acquatici ed in un certo numero di prodotti alimentari differenti (0.1-235 ng/g) (Guenther et al, 2002; Lu et al, 2007; Vazquez-Duhalt et al, 2006; Ying et al, 2002), quali ad esempio burro, cereali e bastoncini di pesce.

Inoltre, il NP ha un'alta affinità per le frazioni lipidiche, di gran lunga superiore a quelle degli altri AP esaminati ed il latte umano è molto ricco in lipidi (Ohta et al, 2002).

Per capire meglio i fattori che potrebbero influenzare la variabilità delle concentrazioni di NP nel latte materno, i risultati sono stati confrontati con le informazioni sulle abitudini alimentari delle madri (Ademollo et al. 2008). I livelli elevati di NP sono stati registrati nei campioni di latte dalle madri che hanno dichiarato di mangiare spesso pesce, rispetto a quelle donne che lo mangiavano soltanto una volta alla settimana. Questo rapporto è conforme con il fatto che il consumo dei frutti di mare rappresenta una fonte principale di esposizione alimentare agli AP.

Per tale motivo, sono state promosse dall'Unione Europea alcune importanti azioni, come la riduzione del NP negli

alimenti (Parlamento Europeo ed Unione Europea, 2000; Parlamento Europeo e Consiglio di Unione Europea, 2001; Parlamento Europeo e Consiglio di Unione Europea, 2003) e alcune misure precauzionali, come l'applicazione in alcuni paesi di limitare il consumo dei frutti di mare da parte delle donne durante la gravidanza (campagna del Detox di WWF, 2005; Huffling, 2006; Hibbeln et al, 2007).

IV CAPITOLO

SCOPO DELLA RICERCA

E' stato messo in evidenza che ci sono molti processi ed organi nel sistema endocrino che possono essere considerati bersagli dei distruttori endocrini (EDCs), come ad esempio la ghiandola adrenale e la tiroide.

Nonostante il ruolo di fondamentale importanza che la ghiandola adrenale svolge all'interno del sistema endocrino, i test per la valutazione della sua funzionalità risultano assenti nella maggior parte delle analisi di tossicità.

La ghiandola adrenale è controllata principalmente dall'adenoipofisi e rappresenta un bersaglio per la tossicità.

Accanto agli studi sulla funzionalità della ghiandola adrenale, stanno avendo sviluppo anche quelli relativi alla funzione tiroidea. Infatti gli ormoni tiroidei hanno un ruolo di primo piano nello sviluppo del cervello, nell'intelligenza, e nel comportamento, oltre a essere coinvolta nella regolazione del metabolismo anabolico, nel differenziamento cellulare, nella crescita e nello sviluppo degli organi.

Un gruppo di EDC molto importante appartenente alla classe dei fenoli è quello degli alchilfenoli (AP), in particolar modo il nonilfenolo e l'octilfenolo, sostanze utilizzate come agenti tensioattivi nell'industria, dotati di attività estrogenica (Mueller e Kim 1978).

Il nonilfenolo (NP) e l'octilfenolo (OP) devono la loro tossicità alla capacità di persistere accumulandosi nelle acque, nei sedimenti e di bioaccumularsi nei tessuti degli organismi acquatici e progressivamente nella catena alimentare (Nimrod et al 1996 a, b).

Partendo da queste conoscenze, il mio progetto di ricerca ha avuto come primo obiettivo quello di investigare gli effetti del nonilfenolo sulla ghiandola adrenale e tiroidea mediante uno studio *in vivo*, utilizzando la lucertola *Podarcis sicula* come organismo bioindicatore.

La lucertola *Podarcis sicula* rappresenta un ottimo organismo bioindicatore in quanto è ampiamente diffusa nelle campagne, è facile da catturare, si adatta a vivere in condizioni di laboratorio ed ha le capacità di bioaccumulare e biomagnificare.

Gli studi *in vivo* sono essenziali per testare l'effetto dei distruttori endocrini a livello sistemico e per capire il meccanismo attraverso cui essi possono determinare l'insorgenza di patologie.

Come secondo obiettivo, per ampliare le conoscenze riguardo gli alchilfenoli, è stato realizzato uno studio *in vivo* su esemplari di *Podarcis sicula* per valutare gli effetti dell'octilfenolo a livello della ghiandola adrenale e tiroidea, allo scopo di rilevare le possibili differenze tra i due AP in modo particolare sugli effetti riscontrati in tali ghiandole.

Infine terzo obiettivo del presente progetto di ricerca, è stato eseguire parallelamente al trattamento precedente un trattamento *in vivo* con la miscela di nonilfenolo e octilfenolo per determinare gli effetti della combinazione di tali AP, riscontrati in natura, sulla ghiandola adrenale e tiroidea.

Sono state pertanto eseguite, in seguito ai trattamenti su detti, indagini di tipo biochimico per misurare eventuali variazioni dei livelli plasmatici degli ormoni ipotalamici CRF (**c**orticotropin-**r**eleasing-**f**actor) e TRH (tireotropin-releasing-hormon), degli ormoni ipofisari ACTH e TSH e degli ormoni adrenalici (corticosterone, adrenalina e noradrenalina) e tiroidei (T_3 e T_4) ed indagini istologiche per valutare possibili variazioni morfologiche indotte da tali AP nella ghiandola adrenale, e nella tiroide.

V CAPITOLO

MATERIALI E METODI

Le lucertole *Podarcis sicula*, catturate in campagne prima di essere trattate sono state poste nei terrari per un periodo di circa 15 giorni per eliminare le condizioni di stress dovute alla cattura.

I Trattamento in vivo

Nonilfenolo

Le concentrazioni di nonilfenolo (FLUKA) somministrate agli animali sono state stabilite facendo riferimento alla LD50 (dose letale media) pari a 1231mg/kg/day, presente in letteratura (Polzonetti –Magni et al 2004, Kimura et al 2006), e rapportata al peso dell'organismo modello da noi scelto (*Podarcis sicula*: peso medio 14 grammi).

La dose letale media per *Podarcis* è risultata quindi pari a 17,2 µg/g/day.

La scelta delle dosi da somministrare è stata stabilita facendo riferimento ai dati presenti in letteratura (Polzonetti –Magni et al 2004, Kimura et al 2006) .

E' stato deciso di somministrare due dosi, ovvero **LD50/100** (dose più diluita) e **LD50/10** (dose più concentrata) per evidenziare le possibili differenze di effetto delle diverse concentrazioni e quindi la dose minima tossica di NP per l'organismo bioindicatore scelto. Il trattamento è stato eseguito su 10 gruppi di esemplari in estate (maggio-giugno) in quanto rappresenta il periodo culmine dell'attività metabolica del bioindicatore scelto.

Le dose stabilite di NP sono state sciolte in olio di arachidi e somministrate mediante iniezioni giornaliere intraperitoneali.

GRUPPO 1 -A: 6 iniezioni, ciascuna di 0,172 µg di NP sciolti in 50 µl di olio di arachidi (**Dose A**), con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 2-A: 12 iniezioni, ciascuna di 0,172 µg di NP sciolti in 50 µl di olio di arachidi (**Dose A**), con prelievi dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 3-A: 24 iniezioni, ciascuna di 0,172 µg di NP sciolti in 50 µl di olio di arachidi (**Dose A**), con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 4-A: 38 iniezioni, ciascuna di 0,172 µg di NP sciolti in 50 µl di olio di arachidi (**Dose A**), con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 1 -B: 3 iniezioni, ciascuna di 1,72 µg di NP sciolti in 50µl di olio di arachidi (**Dose B**), con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 2-B: 6 iniezioni, ciascuna di 1,72 µg di NP sciolti in 50 µl di olio di arachidi (**Dose B**), con prelievi dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 3-B: 12 iniezioni, ciascuna di 1,72 µg di NP sciolti in 50 µl di olio di arachidi (**Dose B**), con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 4-B: 18 iniezioni, ciascuna di 1,72 µg di NP sciolti in 50µl di olio di arachidi (**Dose B**), con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

GRUPPO 1-C: (controlli) prelievo eseguito dopo l'ambientazione in terrario (tempo zero).

GRUPPO 2-C: (controlli con olio di arachidi) 38 iniezioni, ciascuna di 50 µl di olio di arachidi, con prelievi eseguiti dopo 24 ore dall'ultima iniezione.

II Trattamento in vivo.

Octilfenolo

La concentrazione di octilfenolo (FLUKA) somministrata agli esemplari è stata stabilita facendo riferimento ai dati presenti in letteratura (Polzonetti –Magni et al 2004, Kimura et al 2008) e ai risultati ottenuti nel precedente trattamento.

La dose scelta è stata: 0,161 µg OP/mg / day

Il trattamento è stato eseguito in estate (maggio-giugno) nel periodo in cui l'attività metabolica del bioindicatore scelto è piuttosto intensa e la dose è stata sciolta in olio di arachidi e somministrata mediante iniezioni intraperitoneali.

Il protocollo sperimentale è stato eseguito su 4 gruppi di esemplari.

I GRUPPO-OP : iniezioni giornaliere , per un totale di 12 iniezioni ciascuna di 0,161 µg di OP e 50 µl di olio di arachidi, con prelievi eseguiti 24 ore dopo l'ultima iniezione.

II GRUPPO-OP : iniezioni giornaliere, per un totale di 22 iniezioni, ciascuna di 0,161 µg di OP e 50 µl di olio di arachidi, con prelievi eseguiti 24 ore dopo l'ultima iniezione.

III GRUPPO-OP: iniezioni giornaliere, per un totale di 22 iniezioni ,ciascuna di 0,161µg di OP e 50µl di olio di arachidi, con prelievi 15 giorni dopo l'ultima iniezione.

GRUPPO c.: (controlli con olio di arachidi) iniezioni giornaliere, per un totale di 22 iniezioni, ciascuna di 50 µl di olio di arachidi, con prelievi eseguiti 24 ore dopo l'ultima iniezione.

III Trattamento in vivo.

Nonilfenolo+Octilfenolo

Le concentrazioni di 4-tert-octilfenolo (Sigma) e nonilfenolo (FLUKA) somministrate agli esemplari di *Podarcis*, sono state definite come nel trattamento precedente .

Il protocollo sperimentale eseguito su 4 gruppi di esemplari è stato realizzato durante il periodo estivo poichè è il periodo in cui il metabolismo del bioindicatore scelto è in piena attività.

La dose scelta è stata di 0,161 µg OP+ 0,172 NP/mg / day

IV GRUPPO-NP+OP: iniezioni giornaliere, per un totale di 10 iniezioni ,ciascuna di 0,161 µg di OP + 0,172 µg di NP e 50 µl di olio di arachidi,con prelievi eseguiti 24 ore dopo l'ultima iniezione.

V GRUPPO-NP+OP: iniezioni giornaliere, per un totale di 17 iniezioni ,ciascuna di 0,161 µg di OP + 0,172 µg di NP e 50 µl di olio di arachidi,con prelievi eseguiti 24 ore dopo l'ultima iniezione.

VI GRUPPO-NP+OP_: iniezioni giornaliere, per un totale di 17 iniezioni ciascuna di 0,161 µg di OP + 0,172 µg di NP e 50 µl di olio di arachidi,con prelievi eseguiti 15 giorni dopo l'ultima iniezione.

GRUPPO c.: (controlli con olio di arachidi) iniezioni giornaliere , per un totale di 17 iniezioni, ciascuna di 50 μ l di olio di arachidi, con prelievi eseguiti 24 ore dopo l'ultima iniezione.

INDAGINI MORFOLOGICHE

Le ghiandole adrenali, immediatamente dopo il prelievo, sono state fissate con una soluzione Wood composta dal 2,5% di bicromato di potassio, 1% solfato di sodio anidro e formaldeide al 10% (1 formaldeide/10 soluzione), in 100 cc tampone acetato 5 M a pH 4,0 (Wood 1963), per gli studi morfologici.

Le ghiandole tiroidee invece sono state fissate con la soluzione Bouin (Acido picrico - formaldeide – acido acetico).

Dopo la fissazione e la disidratazione, le ghiandole adrenali , tiroidee sono state incluse in paraffina ed affettate al microtomo ad uno spessore di 7 μ m.

Le sezioni di tiroide sono state colorate con la tricromica di Mallory secondo Galgano , mentre le sezioni di ghiandola adrenale con tre differenti colorazioni: colorazione tricromica di Mallory secondo Galgano, colorazione di Giemsa modificata secondo Pearse, colorazione di Wood.

Colorazione tricromica di Mallory secondo Galgano

Le sezioni sono state sparaffinate e idratate per consentire la colorazione delle stesse.

Sono state poi immerse in emallume acido di Mayer, che rappresenta per gli istologi il colorante nucleare più duraturo (Beccari- Mazzi). E' seguito un breve passaggio in Fucsina acida all'1% (30 sec), che è adoperata come colorante citoplasmatico di contrasto. Le sezioni sono state poi immerse in acido fosfomolibdico (5 min) che agisce da mordenzante per migliorare la colorazione dei tessuti. Dopo eliminazione del colorante in eccesso con acqua di fonte ed un successivo passaggio in acido fosfomolibdico, è stata utilizzata la miscela Mallory (30 min) che colora citoplasma e connettivo. In alcool 95° è stato effettuato il differenziamento, seguito da disidratazione, chiarificazione e montaggio.

Colorazione di Giemsa modificata secondo Pearse

Questa colorazione si articola in due giornate. Nel caso delle ghiandole adrenali, infatti, le cellule cromaffini, rappresentate da cellule ad adrenalina e noradrenalina sono distinte tra loro solo se il reattivo Giemsa rimane a contatto con le sezioni per un tempo non inferiore alle 16 ore. Dopo la sparaffinatura e la successiva idratazione, le sezioni sono state lasciate per circa 30 min in acqua distillata e poi poste nel reattivo di Giemsa (Azzurro-Eosina, blu di metilene < 1%) per una notte. Dopo circa 16 ore, è stato effettuato un breve passaggio in acqua distillata, la differenziazione in alcool 95°, la disidratazione, la chiarificazione ed il montaggio. Dopo questa colorazione, le cellule a noradrenalina appaiono colorate in verde scuro e quelle ad adrenalina in verde chiaro.

Colorazione di Wood

Le sezioni sparaffinate, idratate e poste sotto acqua di fonte per 30 min, dopo un breve passaggio in acqua distillata sono state immerse nel colorante costituito da una miscela di Yellow eosina, blu di anilina e buffer acetato a pH 4, per 15 min. Dopo un breve lavaggio in acqua distillata viene effettuato il differenziamento in alcool 95°, la disidratazione, la chiarificazione ed il montaggio.

INDAGINI RADIOIMMUNOLOGICHE I

Ormone Ipotalamico: *CRF*

Ormone ipofisario: *ACTH*

Ormoni adrenalici : *Corticosterone, Adrenalina e Noradrenalina*

Sui campioni di sangue prelevati sono stati effettuati dosaggi ormonali per CRF, ACTH, corticosterone, adrenalina e noradrenalina. I campioni di sangue sono stati prelevati mediante puntura intracardiaca con capillari eparinizzati. Il sangue, poi, è stato centrifugato a 1500 rpm per 10 min per ottenere il plasma.

La concentrazione di CRF nel plasma viene misurata tramite un dosaggio immunoradiometrico a due-siti (IRMA) usando anticorpo di coniglio. La sensibilità, intesa come dose minima rilevabile (M.D.D.) che si può distinguere dallo standard zero, è di 39 pg/ml. La concentrazione analitica è stata calcolata automaticamente da un computer connesso a uno spettrometro a raggi γ . Il coefficiente di variazione inter saggio è minore del 5%.

La metodica IRMA a due siti è stata usata anche per misurare la concentrazione di ACTH nel plasma usando anticorpi monoclonali di topo (DIAGNOSTIC Products

Corp.). Acido borico viene aggiunto al siero per preservare adeguatamente l'ACTH. La sensibilità è di 0.1 pg/ml, i coefficienti di variazione inter ed intra-dosaggio sono rispettivamente 10% e 6%.

La concentrazione di corticosterone nel siero è stata misurata usando un kit di dosaggio radioimmunologico sensibile ed altamente specifico (ICN BIOMEDICAL, Inc., COSTA MESA, CA). Prima del dosaggio i campioni sono stati diluiti 1: 3 con il diluente del kit e riscaldati a 80° C per 10 min per inattivare le proteine che si legano al corticosterone. Il titolo di corticosterone viene espresso in picogrammi per millilitro (pg/ml) e calcolato usando la curva standard prodotta dal dosaggio. Le curve standard sono preparate in buffer con concentrazioni note di corticosterone non radioattivo (0, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 pg/ml) comprato da Amersham Corp. (Arlington Heights, IL). La minima concentrazione distinguibile dallo zero è 0.176 pg/ml. La cross-reattività del corticosterone con altri steroidi è la seguente: 1.3% per deossicorticosterone; < 1% per progesterone e cortisolo; < 0.1% per aldosterone, 20- α deidroprogesterone, testosterone e 11-deossicortisol; e < 0.01% per tutti gli altri steroidi esaminati. I coefficienti di variazione inter- ed intra-dosaggio sono rispettivamente 3.4% e 5.8%.

Le catecolamine sono estratte dal plasma mediante il metodo di adsorbimento dell'allumina, i livelli di adrenalina e noradrenalina nel plasma sono misurati mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) con rilevamento elettrochimico (Woodward, 1982). HPLC incorpora un sistema di distribuzione del solvente Varian Star 9012 (Varian Chromatography System, Walnut Creek, CA, USA) accoppiato ad un rilevatore elettrochimico Princeton Applied Research 400 (EG & G Instruments Corporation, Princeton, NJ, USA). I campioni (200 µl) estratti con allumina sono fatti passare attraverso una colonna Ultratechsphere ODS-C18 5 µm (HPLC Technology Ltd), usando una fase mobile di catecolamine e metanefrina (Chromsystem Munich, Germany). Le ammine separate sono integrate da un programma software Star Chromatography (version 4.0, Varian). Le concentrazioni sono calcolate relativamente agli standard appropriati e con 3,4-diidrossibenzilamina idrobromide (DHBA) come negli standard interni in tutte le determinazioni, con un limite di rivelazione di 0.1 nmol l⁻¹. La concentrazione delle catecolamine nel plasma sono espresse come pg/ml.

INDAGINE RADIOIMMUNOLOGICHE II

Ormone ipotalamico: *TRH*

Ormone ipofisario: *TSH*

Ormoni tiroidei : T_3 e T_4 .

Il procedimento di raccolta dei campioni di sangue e di preparazione è simile al protocollo eseguito per gli ormoni dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Ghiandola adrenale, ovvero una volta raccolto il sangue posto in capillari eparinizzati viene centrifugato per 10 min. a 15000 rpm in una centrifuga refrigerata.

Per l'ormone ipotalamico TRH e l'ormone ipofisario TSH è stata utilizzato TRH/ TSH IRMA Ultrasensibile Kit (BIORAD, Milano) con metodiche radioimmunometriche, invece i parametri di funzionalità tiroidea (T4 e T3) sono state determinate con metodiche radioimmunologiche (BIO-RAD, Milano).

Per l'ormone ipotalamico TRH è stata eseguita con metodiche radioimmunometriche, TRH-IRMA Ultrasensibile Kit (BIORAD, Milano). Per il Cotube TRH-IRMA, la sensibilità analitica, intesa come dose minima rilevabile (M.D.D.) che si può distinguere dallo standard zero, è inferiore a 0.01 μ UI /ml.

Nel test Cotube TRH i campioni in esame e gli standard (100 µl) vengono dispensati nelle provette rivestite di antilegante, a ciascuna delle quali si aggiunge il reagente catturante/tracciante (100 µl), costituito da una miscela di anticorpo anti TRH marcato con il legante e di anticorpo anti TRH con ^{125}I (10µ Ci).

Dopo un'incubazione di 90 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale a 190 ± 10 rpm, si lava con soluzione detergente (NaN₃ allo 0.5%) e le provette vengono aspirate e poste direttamente in un contatore gamma per la valutazione dei risultati che vengono determinati mediante una curva standard da 0 a 100 µUI/ml usando una funzione cubica "spline".

Per il Cotube TSH-IRMA, la sensibilità analitica, intesa come dose minima rilevabile (M.D.D.) che si può distinguere dallo standard zero, è inferiore a 0.01 µUI /ml.

Le fasi di procedura sono le stesse del test Cotube TRH ma in particolare variano le quantità utilizzate infatti nel test Cotube TSH i campioni in esame e gli standard sono del volume di 200 µl vengono dispensati nelle provette rivestite di antilegante, a ciascuna delle quali si aggiunge il volume 200 µl di reagente catturante/tracciante, costituito da una miscela di anticorpo anti TSH marcato con il legante e di anticorpo anti TSH con ^{125}I (10µ Ci).

Dopo un'incubazione di 90 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale a 190 ± 10 rpm, si lava con soluzione detergente (NaN_3 allo 0.5%) e le provette vengono aspirate e poste direttamente in un contatore gamma per la valutazione dei risultati che vengono determinati mediante una curva standard da 0 a $100 \mu\text{UI/ml}$ usando una funzione cubica "spline".

Per quanto riguarda il T_4 , la dose minima di T_4 che si può distinguere dallo standard zero, è di 0.45 ng/ml . Le variazioni intra e intersaggio sono rispettivamente 4.6% e 4.3%. Per eseguire questo test, $50 \mu\text{l}$ di siero del campione in esame vengono posti in una provetta sensibilizzata di antisiero anti- T_4 prodotto nel coniglio e contemporaneamente in provette analoghe si pongono $50 \mu\text{l}$ di standard. In tutte queste provette si aggiunge poi 1 ml di T_4 marcato con ^{125}I (18.5 microCi) che compete con il T_4 presente nel siero del campione e negli standard per i siti di legame dell'anticorpo adeso alla provetta (Coated-tube).

Dopo un'incubazione di 2 ore a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ si aspirano tutte le provette e si contano su un contatore gamma a scintillazione in grado di rilevare il decadimento radioattivo dello ^{125}I in 1 minuto.

La concentrazione di T_4 nel siero del campione viene calcolata mediante interpolazione sulla curva di taratura su carta logit-log.

Per il T_3 , la sensibilità analitica è di 0.1 ng/ml, la variazione intrasaggio è di 1.0-2.6%, mentre quella intersaggio è di 3.9-5.7 %.

Le fasi di procedura del test sono le stesse di quelle del T_4 , tranne che per le quantità degli standard e dei campioni in esame (100 μ l) da porre nelle rispettive provette sensibilizzate con anticorpo anti- T_3 prodotto nel coniglio.

Analisi Statistica Dei Dosaggi Ormonali

Tutti i dati presentati sono espressi come media \pm l'errore standard e per tutti i dati è stata condotta un'analisi statistica mediante il test Duncan's - ANOVA (analisi parametrica della varianza ad un criterio di classificazione).

La significatività statistica dei risultati è stata determinata con lo Student's *t*-test e sono stati considerati validi i valori con $P < 0.05$.

VI CAPITOLO

RISULTATI

I Trattamento *in vivo*: NP

Effetti del nonilfenolo sulle ghiandole adrenali di Podarcis sicula

In seguito al trattamento con il nonilfenolo sono state condotte contemporaneamente sia analisi ormonali che morfologiche per evidenziare gli effetti di questo fenolo, appartenente alla categoria dei distruttori endocrini, sulla funzionalità della ghiandola adrenale della lucertola *Podarcis sicula*.

Esemplari di Controllo

La ghiandola adrenale della lucertola *Podarcis sicula*, come negli altri vertebrati, è costituita sia da tessuto steroidogenico che da tessuto cromaffine. Il tessuto steroidogenico occupa la maggior parte della ghiandola adrenale. Esso è organizzato in cordoni formati da due file di cellule, inframmezzati da vasi sanguigni di piccolo diametro. Le cellule steroidogeniche sono di forma

allungata; il nucleo è disposto nella parte basale della cellula con un nucleolo evidente.

La porzione midollare è costituita da più file di cellule cromaffini, disposte lungo il margine dorsale della ghiandola a costituire un cordone che invia propaggini tra i cordoni di tessuto steroidogenico. Le cellule sono di forma poligonale, vicine tra loro, ben colorate, con nuclei e nucleoli ben evidenti. Le cellule a noradrenalina, che appaiono di colore verde scuro con la colorazione Giemsa e di colore giallo oro con la colorazione di Mallory e con la colorazione di Wood, si trovano lungo il margine più esterno del tessuto cromaffine, mentre la parte più interna è costituita da cellule ad adrenalina, che danno anche luogo a brevi infiltrazioni tra i cordoni di cellule steroidogeniche e che si colorano in verde chiaro con la colorazione di Giemsa e in rosso sia con la colorazione di Mallory che con quella di Wood. Tra i cordoni steroidogenici, si trovano sparsi isolotti composti esclusivamente da cellule ad adrenalina. Le cellule a noradrenalina sono più piccole di quelle ad adrenalina ed hanno grandi granuli secretori dispersi nel citoplasma, che sono meno abbondanti dei granuli citoplasmatici delle cellule ad adrenalina. Al contrario, le cellule ad adrenalina hanno un diametro maggiore e presentano nel

citoplasma, numerosi, piccoli granuli secretori, piuttosto vicini tra loro.

La ghiandola adrenale della lucertola *Podarcis sicula* è inoltre caratterizzata da un periodo invernale (dicembre-febbraio) di stasi metabolica e un periodo estivo (maggio-luglio), in cui è in piena attività funzionale. Le maggiori differenze tra il periodo invernale ed estivo si riscontrano a livello del tessuto steroidogenico, il quale, nel periodo estivo presenta un aumento delle dimensioni dei cordoni, un'attiva sintesi e secrezione degli ormoni steroidei e un' aumentata vascolarizzazione (Fig. 5 a).

Esemplari Trattati

Nonilfenolo: LD50/100

Negli esemplari sacrificati dopo sei iniezioni di nonilfenolo, si è potuto osservare una lieve stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale (Fig. 2). Infatti, in seguito al trattamento, abbiamo un leggero aumento dei livelli plasmatici del fattore ipotalamico CRF (corticotropin-releasing factor), che passa dal valore di 1.53 ± 0.08 pg/ml negli esemplari di controllo al valore di 2.18 ± 0.11 pg/ml negli esemplari trattati (Fig. 3 a). In accordo con l'aumento del CRF, anche i valori dell'ormone ipofisario ACTH aumentano leggermente passando dal valore di 6.58 ± 0.32 pg/ml nei controlli al valore di 7.15 ± 0.35 pg/ml negli esemplari trattati (Fig. 3 a). La leggera stimolazione è evidente anche a livello della ghiandola adrenale in quanto i livelli plasmatici di corticosterone passano da 7.40 ± 0.37 pg/ml negli esemplari di controllo a 8.10 ± 0.40 pg/ml negli esemplari sacrificati dopo 6 iniezioni. Per quanto riguarda le catecolamine, invece, abbiamo una leggera diminuzione dei livelli plasmatici di noradrenalina che passa da 486 ± 24.3 pg/ml negli esemplari di controllo a 317 ± 15.85 pg/ml negli esemplari trattati (Fig. 3 b). Situazione opposta, invece si registra per i livelli

plasmatici di adrenalina che aumentano dal valore di 315 ± 15.75 pg/ml nei controlli al valore di 423 ± 21.15 pg/ml negli esemplari che hanno ricevuto 6 iniezioni (Fig. 3 b). La leggera stimolazione a livello ormonale non è evidenziabile a livello morfologico in quanto gli esemplari sacrificati dopo 6 iniezioni presentano un aspetto simile al controllo con una normale distribuzione delle cellule a noradrenalina e ad adrenalina (Fig. 5 b).

Da notare, comunque, una iniziale ipervascolarizzazione della ghiandola (Fig. 5 b).

Negli esemplari sacrificati dopo 12 iniezioni di nonilfenolo assistiamo ad un incremento dell'effetto stimolatorio di tale sostanza evidenziabile sia a livello ormonale che morfologico. Infatti, i livelli plasmatici di CRF aumentano fino al valore di 3.41 ± 0.17 pg/ml (Fig. 3 a), mentre quelli di ACTH aumentano al valore di 8.29 ± 0.41 pg/ml (Fig. 3 a). Di pari passo, anche il corticosterone aumenta fino al valore di 9.16 ± 0.46 pg/ml (Fig. 4 a). Per quanto riguarda le catecolamine abbiamo un ulteriore decremento della noradrenalina (289 ± 14.45 pg/ml) ed un conseguente aumento dell'adrenalina (723 ± 36.15 pg/ml) (Fig. 3 b). A livello morfologico, infatti si nota un incremento del numero di cellule ad adrenalina che iniziano a disporsi anche negli strati più esterni del cordone cromaffine normalmente occupati da sole cellule

a noradrenalina (Fig.5 d). Inoltre si possono osservare cordoni steroidogenici leggermente ipertrofici, con una maggiore vacuolizzazione a livello delle cellule steroidogeniche ed una discreta vascolarizzazione dell'intera ghiandola (Fig. 5 c).

Negli sacrificati dopo 24 iniezioni di nonilfenolo, abbiamo osservato una netta stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale. Infatti i valori di CRF sono aumentati fino a 8.15 ± 0.41 pg/ml (Fig. 3 a), quelli di ACTH a 9.93 ± 0.5 pg/ml (Fig. 4 a), mentre quelli di corticosterone fino al valore di 14.8 ± 0.74 pg/ml (Fig. 3 a). La stimolazione da parte del nonilfenolo è evidente anche a livello delle catecolamine in quanto abbiamo una forte diminuzione della noradrenalina (99 ± 4.95 pg/ml) ed un netto incremento dei livelli plasmatici di adrenalina (976 ± 48.8 pg/ml) (Fig. 3 b). Tale quadro biochimico è avvalorato anche dal punto di vista morfologico in quanto abbiamo evidenziato uno svuotamento delle cellule cromaffini che risultano poco colorabili (Fig. 6 a) e laddove sono presenti una chiara prevalenza di cellule ad adrenalina su quelle a noradrenalina. Infine i cordoni steroidogenici appaiono maggiormente ipertrofici rispetto al controllo e tutta la ghiandola risulta più vascolarizzata (Fig. 6 b).

Nel caso del trattamento prolungato, in cui gli esemplari hanno ricevuto 38 iniezioni, è stato possibile osservare un ulteriore aumento della stimolazione a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale. Infatti, i valori plasmatici di CRF arrivano fino al valore massimo di 9.01 ± 0.45 pg/ml l'ACTH aumenta ulteriormente al valore di 12.8 ± 0.64 pg/ml ed il corticosterone fino al valore di 21.2 ± 1.06 pg/ml (Fig. 3 a). Le catecolamine, inoltre, presentano un ulteriore abbassamento dei valori di noradrenalina (71 ± 3.55 pg/ml) ed un poderoso incremento dei livelli plasmatici di adrenalina che raggiungono un picco a 1215 ± 60.75 pg/ml (Fig. 3 b). Dal punto di vista morfologico, abbiamo osservato un completo svuotamento delle cellule cromaffini che appaiono quasi completamente incolori e presentano, ad un forte ingrandimento, uno scarso numero di granuli. A livello del tessuto steroidogenico abbiamo cordoni ipertrofici con vacuolizzazione del citoplasma delle cellule steroidee. Da notare, infine, la presenza di una marcata infiltrazione macrofagica evidenziabile soprattutto a ridosso della capsula di tessuto connettivo che circonda la ghiandola (Fig. 6 c).

Non si riscontrano differenze tra i controlli sacrificati a tempo zero ed i controlli che hanno ricevuto 38 iniezioni di olio di arachidi.

Nonilfenolo: LD50/10

Analogamente alla dose A (LD 50/100), anche negli esemplari trattati con la dose B (LD 50/10) è stato possibile mettere in evidenza un effetto stimolatorio del nonilfenolo sull'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole adrenali della lucertola *Podarcis sicula* (Fig. 2). Già nel gruppo di animali sacrificati dopo 3 iniezioni dall'inizio del trattamento la ghiandola adrenale presenta leggeri segni di stimolazione.

Con tale trattamento, si è registrato un incremento dei livelli plasmatici di CRF pari a $6,15 \pm 0,30$ pg/ml rispetto al controllo ($1,53 \pm 0,08$ pg/ml) (Fig. 4 a).

I livelli plasmatici dell'ormone ACTH risultano anch'essi incrementati, passano infatti da un valore di 6.58 ± 0.32 pg/ml del gruppo di controllo a $8,21 \pm 0,41$ pg/ml (Fig. 4 a).

Nella ghiandola adrenale i livelli di corticosterone passano da $7,40 \pm 0,37$ pg/ml (gruppo controllo) a $18,9 \pm 0,94$ pg/ml (Fig. 4 a).

Le catecolamine sono invece caratterizzate da un incremento dei valori di adrenalina pari a $632 \pm 31,6$ pg/ml e una diminuzione dei livelli di noradrenalina pari a $146 \pm 7,3$ pg/ml (Controllo: Noradrenalina $486 \pm 24,3$ pg/ml Adrenalina $315 \pm 15,75$ pg/ml) (Fig. 4 b).

Morfologicamente la ghiandola risulta molto simile a quella osservata nei controlli.

Negli esemplari del gruppo a cui sono state somministrate 6 iniezioni di nonilfenolo, si evidenzia invece un aumento più significativo dei livelli di CRF pari infatti a $7.09 \pm 0,35$ pg/ml, dei livelli plasmatici di ACTH ($9.13 \pm 0,45$ pg/ml) e di corticosterone (Fig. 4 a).

Morfologicamente si nota una ipertrofia dei cordoni del tessuto steroidogenico rispetto alla ghiandola di controllo ed una maggiore dilatazione dei capillari sanguigni.

Si assiste inoltre ad un aumento dei livelli plasmatici di adrenalina che passano da un valore di $315 \pm 15,75$ pg/ml negli esemplari di controllo al valore di $845 \pm 42,25$ pg/ml negli esemplari sacrificati dopo 6 iniezioni (Fig. 4 b). Un andamento inverso si registra invece per la noradrenalina, che passa da un valore di $486 \pm 24,3$ pg/ml negli esemplari di controllo a quello di $123 \pm 6,15$ pg/ml (Fig. 4 b). Per quel che riguarda gli esemplari sacrificati dopo il trattamento con 12 iniezioni, risultano caratterizzati a livello ormonale da un'intensa stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale.

Si osserva, infatti, un significativo incremento dei livelli plasmatici del CRF corrispondente a $8,63 \pm 0,43$ pg/ml e dell'ormone ACTH che raggiunge un valore di $10.3 \pm 0,62$

pg/ml (Fig. 4 a). Segni bene evidenti di stimolazione da parte del nonilfenolo sono confermati anche dai livelli plasmatici di corticosterone che salgono fino ad un valore di ben $18.9 \pm 0,94$ pg/ml (Fig. 4 a). Il nonilfenolo ha avuto effetti significativi anche sui livelli plasmatici delle catecolamine: l'adrenalina aumenta in modo considerevole fino ad un valore di $989 \pm 49,45$ pg/ml negli esemplari trattati con 12 iniezioni, al contrario della noradrenalina i cui livelli plasmatici si riducono a $85 \pm 4,25$ pg/ml (Fig. 4 b).

A conferma dei dati biochimici riscontrati, morfologicamente si riscontra un'accentuata stimolazione del tessuto steroideogenico che presenta cordoni ipertrofici con capillari sanguigni molto dilatati, un completo svuotamento delle cellule cromaffini che appaiono incolori dopo le colorazioni istologiche e la comparsa di un elevato numero di macrofagi a livello connettivale (Fig. 6 d).

I Trattamento in vivo: NP

Effetti del nonilfenolo sulle ghiandole tiroidee di *Podarcis sicula*

In seguito al trattamento con il nonilfenolo sono state condotte contemporaneamente sia analisi ormonali che morfologiche per evidenziare gli effetti di questo fenolo, sulla funzionalità della ghiandola tiroidea della lucertola *Podarcis sicula*.

Esemplari Controllo

La lucertola *Podarcis sicula* è caratterizzata da una ghiandola tiroidea di aspetto nastriforme, posta trasversalmente a metà trachea.

In particolare la tiroide è avvolta da una capsula connettivale dalla quale si originano setti di tessuto connettivo, all'interno dei quali sono presenti vasi e nervi, e che, convergendo verso l'interno della ghiandola, la suddividono in lobuli.

Tale ghiandola in *Podarcis* presenta un ciclo annuale e mostra evidenti differenze morfologiche in relazione all'attività funzionale.

Il ciclo inizia con una stasi funzionale in Novembre per proseguire con un rallentamento dell'attività quasi totale in Dicembre-Gennaio; segue, poi, un periodo di discreta attività in Maggio e un massimo della funzionalità in Giugno-Luglio. Nel periodo invernale (Dicembre-Gennaio) le cellule dei follicoli tiroidei sono appiattite e hanno colloide abbondante, densa ed omogenea. Nel periodo estivo (Giugno-Luglio) i follicoli si fanno più piccoli e diventano irregolari, la colloide diminuisce, compaiono numerosi vacuoli di riassorbimento, l'altezza dell'epitelio raggiunge i 15-20 μm , il nucleo si posiziona centralmente e la vascolarizzazione aumenta. A tali cambiamenti morfologici si accompagnano variazioni nei livelli plasmatici di T_3 e di T_4 che aumentano nel periodo Maggio-Giugno (Fig. 10 a).

Esemplari Trattati

Nonilfenolo: LD50/100

Negli esemplari sacrificati dopo 6 iniezioni di nonilfenolo è stata riscontrata una leggera inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (Fig. 7).

In particolar modo è stato rilevato un lieve aumento del fattore ipotalamico TRH ($3,15 \pm 0,15 \mu\text{UI/ml}$) rispetto ai controlli ($2.85 \pm 0,14 \mu\text{UI/ml}$), una diminuzione dei livelli plasmatici dell'ormone ipofisario TSH che va da $5.15 \pm 0.26 \mu\text{UI/ml}$ (gruppo di controllo) a $3.26 \pm 0.16 \mu\text{UI/ml}$ (Fig. 8 a). In accordo con la diminuzione di TSH anche i valori degli ormoni tiroidei T_3 e T_4 risultano ridotti, infatti T_3 passa da $4.62 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$ negli esemplari di controllo (gruppo di controllo) a $3.15 \pm 0.16 \text{ ng/ml}$ e T_4 da $5.89 \pm 0.29 \text{ ng/ml}$ (gruppo di controllo) a $2.46 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$ (Fig. 8 b).

Per quel che riguarda gli esemplari che hanno ricevuto 12 iniezioni di NP, è evidente un aumento dei livelli plasmatici di TRH ($5.10 \pm 0.15 \mu\text{UI/ml}$), una riduzione dei livelli plasmatici di TSH che arriva al valore di $3.12 \pm 0.15 \mu\text{UI/ml}$ (Fig. 8 a) e un ulteriore decremento di T_3 e T_4 che raggiungono rispettivamente i valori di $2.28 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$ (T_3) e $2.46 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$ (T_4) (Fig. 8 b).

L'inibizione riscontrata a livello ormonale non è ben evidente a livello morfologico, non solo per gli esemplari trattati con 6 iniezioni ma anche per quelli trattati con 12 iniezioni, in quanto l'aspetto istologico non si discosta particolarmente da quello dei controlli. Infatti la ghiandola tiroidea appare riccamente vascolarizzata con l'epitelio follicolare alto ($12.5 \pm 0.03 \mu\text{m}$), i tireociti di forma cilindrica, e con la colloide in fase di attivo riassorbimento.

Negli esemplari trattati con 24 iniezioni di NP, abbiamo osservato un incremento dei livelli plasmatici dell'ormone TRH infatti raggiungono il valore di $8,90 \pm 0.44 \mu\text{UI/ml}$ rispetto al valore di controllo di $2.85 \pm 0.14 \mu\text{UI/ml}$ e una forte diminuzione dei livelli plasmatici di TSH, fino al valore di $0.98 \pm 0.05 \mu\text{UI/ml}$ (Fig. 8 a). In accordo con tali valori, anche i livelli plasmatici di T_3 e di T_4 diminuiscono sensibilmente arrivando a valori di $0.90 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$ (T_3) e $1.00 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$ (T_4) (Fig. 8 b).

A livello morfologico è ben evidente la riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare che diviene medio-basso ($6.95 \pm 0.04 \mu\text{m}$), mentre la colloide è retratta e priva di vacuoli di riassorbimento (Figg. 8 b - c).

Gli esemplari che hanno ricevuto 38 iniezioni, risultano caratterizzati da uno spiccato aumento dei livelli

plasmatici del TRH pari infatti a 9.45 ± 0.47 μ UI/ml (Fig. 8 a).

In contrapposizione i livelli plasmatici di TSH diminuiscono fortemente raggiungendo i valori di 0.15 ± 0.07 μ UI/ml (Fig. 8 a) e i livelli di T_3 e T_4 risultano nettamente ridotti fino a 0.48 ± 0.02 ng/ml (T_3) e 0.58 ± 0.03 ng/ml (T_4) (Fig. 8 b).

I risultati morfologici confermano i livelli ormonali riscontrati in quanto la ghiandola tiroidea degli esemplari presenta una notevole riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare (3.05 ± 0.02 μ m) rispetto ai controlli, e conformemente anche i nuclei dei tireociti sono piccoli ed allungati, con cromatina densa ed il citoplasma ridotto ad un sottile velo. Inoltre i follicoli appaiono per la maggior parte svuotati della colloide, e in quelli in cui è presente la si trova in fase fortemente retrattiva (Fig. 10 d). In seguito a tale trattamento è stato inoltre riscontrato un tasso di mortalità pari al 27,5% (Fig. 23).

Nonilfenolo: LD50/10

Negli esemplari trattati con il nonilfenolo nella dose pari a LD50/10 (DOSE B) in modo simile alla dose A (LD50/100) è stato possibile mettere in evidenza un effetto inibitorio di tale EDC sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide della lucertola *Podarcis sicula* (Fig. 7).

Nel gruppo di animali sacrificati dopo 3 iniezioni, i risultati biochimici mostrano i primi segni di tale inibizione, infatti risultano ridotti sia i livelli di TSH ($1,43 \pm 0,07 \mu\text{UI/ml}$) (Fig. 9 a) che di T_3 ($1,56 \pm 0,08 \text{ ng/ml}$) e T_4 ($1,03 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$) (Fig. 9 b) rispetto alle condizioni di controllo (controllo tempo zero = TSH: $5.15 \pm 0.26 \mu\text{UI/ml}$; T_3 : $4.62 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$; T_4 : $5.89 \pm 0.29 \text{ ng/ml}$).

Morfologicamente non vi sono particolari differenze rispetto ai controlli.

L'inibizione diviene maggiormente accentuata biochimicamente dopo 6 iniezioni infatti si riducono sia i livelli plasmatici di TSH (Fig. 9 a) ($1,09 \pm 0,05 \mu\text{U/ml}$), che di T_3 ($1,11 \pm 0,055 \text{ ng/ml}$) e di T_4 ($1,22 \pm 0,061 \text{ ng/ml}$) (Fig. 9 b). Morfologicamente rispetto alle condizioni di controllo è ben evidente un appiattimento dell'epitelio follicolare.

Dopo 12 iniezioni i dati biochimici registrano una ulteriore diminuzione dei valori di TSH, T_3 e T_4 , che

raggiungono rispettivamente $0,73 \pm 0,036 \mu\text{UI/ml}$ (TSH) (Fig. 9 a), $0,66 \pm 0,033\text{ng/ml}$ (T_3), $0,79 \pm 0,039 \text{ ng/ml}$ (T_4) (Fig. 9 b). Dal punto di vista morfologico è stata riscontrata una riduzione ulteriore dell'altezza dell'epitelio follicolare ed una forte retroazione della colloide.

I dati biochimici relativi all'ormone ipotalamico TRH mettono in evidenza nuovamente le similitudini di tale trattamento (NP = LD50/10) con il precedente trattamento (NP = LD50/100) infatti i livelli di TRH nel corso di tale trattamento si incrementano passando da $2.85 \pm 0,14 \mu\text{UI/ml}$ nel controllo a $4.22 \pm 0.21 \mu\text{UI/ml}$ negli esemplari trattati con tre iniezioni e $8.20 \pm 0,41 \mu\text{UI/ml}$ con 6 iniezioni, raggiungendo il picco a 12 iniezioni ($9.11 \pm 0,45 \mu\text{UI/ml}$) (Fig. 9 a).

Non vi sono dati riguardanti gli esemplari trattati con 18 iniezioni in quanto tale dose è risultata essere letale.

E' stato infatti riscontrato in seguito a tale trattamento un tasso di mortalità è pari al 32,5% (Fig. 23).

Il Trattamento *in vivo*: OP

Effetti dell'octilfenolo sulle ghiandole adrenali di Podarcis sicula.

Esemplari Trattati:

Il quadro biochimico e morfologico rilevato in seguito a tale trattamento è in accordo con quello riscontrato con il trattamento con il nonilfenolo (Fig. 11).

In modo particolare dai dosaggi ormonali e dall'analisi morfologica spicca un effetto stimolatorio di OP sulla ghiandola adrenale più accentuato rispetto al trattamento precedente (NP).

Già negli esemplari dopo 12 iniezioni di OP si è potuto osservare una stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale, infatti abbiamo un considerevole aumento dei livelli plasmatici di CRF che dal valore di $2,32 \pm 0,12$ pg/ml riscontrato nel gruppo di controllo raggiunge il valore di valore di $9,15 \pm 0,46$ pg/ml (Fig. 12 a).

In accordo con l'aumento del CRF, anche i valori di ACTH negli esemplari trattati con 12 iniezioni di OP aumentano,

passando da 6.63 ± 0.33 pg/ml negli esemplari di controllo a 11.3 ± 0.56 pg/ml (Fig. 12 a).

Tale stimolazione è evidente anche a livello della ghiandola adrenale in quanto i livelli plasmatici di corticosterone passano da 7.14 ± 0.38 pg/ml (Gruppo di controllo) a 14.5 ± 0.72 pg/ml (Fig.12 a),

Si registra una situazione opposta per i livelli plasmatici di noradrenalina che si riducono da $512 \pm 25,6$ pg/ml nei controlli a $117 \pm 5,85$ pg/ml in tale gruppo di trattamento (Fig. 12 b).

L'adrenalina invece aumenta nettamente da 346 ± 17.3 pg/ml nei controlli a 956 ± 47.8 pg/ml (Fig. 12 b).

Morfologicamente, tale stimolazione è confermata da una leggera dilatazione dei cordoni steroidogenici, e da un incremento delle cellule ad adrenalina (Fig. 13 a). Negli esemplari sacrificati dopo 22 iniezioni di OP assistiamo ad un notevole incremento dell'effetto stimolatorio di tale sostanza evidenziabile sia a livello ormonale che morfologico.

I livelli plasmatici di CRF aumentano fino al valore di $11,3 \pm 0,56$ pg/ml (Fig. 12 a), mentre quelli di ACTH aumentano fino al valore di $13,6 \pm 0,68$ pg/ml (Fig. 10 a).

Di pari passo, anche il corticosterone aumenta fino al valore di $15,9 \pm 0,80$ pg/ml (Fig. 12 a).

Per quanto riguarda le catecolamine abbiamo un ulteriore decremento della noradrenalina ($96 \pm 4,8 \text{ pg/ml}$), accompagnato da un conseguente aumento dell'adrenalina ($1023 \pm 51,15 \text{ pg/ml}$) (Fig. 12 b).

Tale quadro biochimico è avvalorato dallo studio morfologico in quanto i cordoni steroideogenici risultano fortemente ipertrofici e poco colorabili, è presente una marcata ipervascolarizzazione della ghiandola; inoltre vi è un aumento delle cellule ad adrenalina che si portano negli strati più esterni del cordone cromaffine normalmente occupati dalle sole cellule a noradrenalina (Fig. 13 b).

Negli esemplari trattati con 22 iniezioni di OP e sacrificati a distanza di 15 giorni dall'ultima iniezione (gruppo di recupero), abbiamo riscontrato un'inversione dei livelli ormonali rispetto agli esemplari dei precedenti gruppi di trattamento, infatti si registra in particolare un ridotto livello plasmatico di CRF pari $6,72 \pm 0,34 \text{ pg/ml}$ rispetto ai valori rilevati nel gruppo di esemplari trattati con 22 iniezioni di OP ma sacrificati 24 ore dopo l'ultima iniezione (CRF: $11,3 \pm 0,56 \text{ pg/ml}$).

Come per il CRF così anche per i livelli dell'ormone ipofisario ACTH ($9,1 \pm 0,45 \text{ pg/ml}$) e dell'ormone adrenale corticosterone ($10,4 \pm 0,52 \text{ pg/ml}$) è stata

registrata una diminuzione rispetto ai valori riscontrati fino ad ora nel corso del trattamento (Fig 12 a).

I livelli plasmatici della noradrenalina invece in tale gruppo (gruppo-recupero) risultano incrementati ($130 \pm 6,5$ pg/ml) rispetto a quelli registrati nei precedenti gruppi di trattamento mentre per l'adrenalina si registra un decremento dei livelli plasmatici che passano dal valore di $1023 \pm 51,15$ pg/ml nel gruppo precedente di trattamento a $941 \pm 47,05$ pg/ml (gruppo-recupero) (Fig. 12 b). Morfologicamente in tale gruppo non sono stati rilevati segni di ripristino delle condizioni fisiologiche.

In seguito a tale trattamento è stato riscontrato un tasso di mortalità pari al 17,5% (Fig. 23).

Effetti dell'octilfenolo sulle ghiandole tiroidee di Podarcis sicula

Negli esemplari sacrificati dopo 12 iniezioni di OP, è stata riscontrata un'inibizione della ghiandola tiroidea, evidenziabile sia dal punto di vista biochimico che morfologico (Fig. 14).

In particolar modo è stato rilevato un aumento del TRH che quasi triplica il suo valore passando dal valore di $3,15 \pm 0,16 \mu\text{UI/ml}$ (gruppo di controllo) a quello di $8,03 \pm 0,40 \mu\text{UI/ml}$ (Fig. 15 a). Al contrario, è stata osservata una diminuzione dei livelli plasmatici di TSH che vanno dal valore di $7.23 \pm 0,36 \mu\text{UI/ml}$ (gruppo di controllo) al valore di $3.21 \pm 0.16 \mu\text{UI/ml}$ (Fig. 15 a). In accordo con la diminuzione di TSH, anche i valori di T_3 e T_4 risultano ridotti, infatti T_3 passa da $5.21 \pm 0,26 \text{ng/ml}$ (gruppo di controllo) a $1.22 \pm 0,06 \text{ng/ml}$, e T_4 dal valore di $6.18 \pm 0,31 \text{ng/ml}$ (gruppo di controllo) al valore di $1.46 \pm 0,07 \text{ng/ml}$ (Fig. 15 b).

L'inibizione riscontrata a livello ormonale non è ben evidente a livello morfologico negli esemplari di tale gruppo, infatti la ghiandola tiroidea appare riccamente vascolarizzata con un epitelio follicolare alto ($12.5 \pm 0.03 \mu\text{m}$), i tireociti presentano una forma cubica, e la

presenza di numerosi vacuoli di riassorbimento nella colloide (Fig. 16 a).

Per quel che riguarda gli esemplari che hanno ricevuto 22 somministrazioni di OP, è evidente un ulteriore aumento dei livelli plasmatici di TRH ($8.48 \pm 0,42 \mu\text{UI/ml}$) (Fig.15 a).

Il TSH invece ha subito una notevole riduzione da $7.23 \pm 0,36 \mu\text{UI/ml}$ nel controllo a $1.98 \pm 0,10 \mu\text{UI/ml}$; analogamente T_3 e T_4 passano rispettivamente al valore di $1.00 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$ (T_3) e $2.43 \pm 0,12 \text{ ng/ml}$ (T_4) (Figg.15 a-b).

Tali dati biochimici sono confermati anche a livello morfologico infatti l'epitelio follicolare diviene medio-basso ($6.5 \pm 0.04 \mu\text{m}$), mentre la colloide è retratta e priva di vacuoli di riassorbimento (Fig. 16 b).

Negli esemplari trattati con 22 iniezioni di OP e sacrificati a distanza di 15 giorni dall'ultima iniezione (gruppo di recupero), abbiamo riscontrato un capovolgimento dei valori degli ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.

Il TRH, che si era incrementato nel corso del trattamento, si riduce in tale gruppo raggiungendo il valore di $7,15 \pm 0,36 \mu\text{UI/ml}$ anche se tale valore è piuttosto lontano dal valore registrato negli esemplari di controllo (TRH: $3,15 \pm 0,16 \mu\text{UI/ml}$) (Fig. 15 a). Per quel che riguarda l'ormone ipofisario TSH e gli ormoni tiroidei T_3 e T_4 , anch'essi

invertono l'andamento fino ad ora riscontrato nel corso del trattamento e incrementano leggermente i loro livelli plasmatici rispetto ai valori rilevati negli altri gruppi di trattamento, ma, analogamente al TRH, tali valori sono lontani dai valori di controllo (Fig. 15 a-b). Si registra in particolare un aumento dei livelli plasmatici di TSH che raggiunge il valore di $2,15 \pm 0,11$ μ UI/ml (Fig.15 a), e di pari passo anche i livelli di T_3 e T_4 si incrementano raggiungendo rispettivamente il valore di $1,26 \pm 0,06$ ng/ml (T_3) e di $1,55 \pm 0,07$ ng/ml (T_4) (Fig.15 b).

Morfologicamente non si è riscontrato nessun segnale di recupero.

III Trattamento in vivo: OP+NP

Effetti della miscela OP+NP sulle ghiandole adrenali di *Podarcis sicula*.

Esemplari Trattati:

Il trattamento combinato con octilfenolo e nonilfenolo ha comportato come negli altri trattamenti una stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale (Fig. 17).

In particolare negli esemplari trattati con 10 iniezioni della miscela OP-NP il quadro biochimico evidenzia un incremento dei livelli plasmatici del fattore ipotalamico CRF che arriva a $10,6 \pm 0,53$ pg/ml, dell'ormone ipotalamico ACTH che raggiunge il valore di $13,2 \pm 0,66$ pg/ml e del corticosterone che dal valore di $7,54 \pm 0,38$ nel gruppo di controllo passa al valore di $16,7 \pm 0,83$ pg/ml in tale gruppo (Fig.18 a).

I livelli plasmatici di noradrenalina invece diminuiscono notevolmente da $512 \pm 25,6$ pg/ml degli esemplari di controllo a $85 \pm 4,25$ pg/ml, mentre i livelli di adrenalina si incrementano quadruplicando il valore registrato nei controlli ($346 \pm 17,30$ pg/ml) raggiungendo il valore di $1465 \pm 73,25$ pg/ml (Fig. 18 b).

L'analisi morfologica ha confermato i dati biochimici infatti la ghiandola adrenale presenta cordoni steroidogenici ipertrofici ed una notevole vascolarizzazione; inoltre vi è un aumento delle cellule ad adrenalina rispetto a quelle a noradrenalina ed entrambi i tipi di cellule cromaffini appaiono poco colorabili (Fig. 19 a).

Negli esemplari trattati con 17 iniezioni della miscela OP+NP, l'effetto stimolatorio a carico della ghiandola adrenale risulta ulteriormente accentuato.

E' stata rilevata infatti una netta stimolazione, a livello ormonale, dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale in quanto sia i livelli di CRF che di ACTH e corticosterone riscontrati sono maggiormente incrementati rispetto ai valori registrati negli esemplari di controllo, infatti il CRF arriva al valore di $13,1 \pm 0,65$ pg/ml, l'ACTH al valore di $16,2 \pm 0,81$ ed il corticosterone raggiunge il livello massimo di $18,2 \pm 0,91$ pg/ml (Fig. 18 a).

Le catecolamine invece sono caratterizzate da un decremento dei livelli plasmatici di noradrenalina pari a $72 \pm 3,6$ pg/ml ed un incremento dei valori di adrenalina che raggiunge il picco massimo a $1541 \pm 77,05$ pg/ml (Fig. 18 b).

Dal punto di vista morfologico la ghiandola adrenale è caratterizzata dalla presenza di una estesa

vacuolizzazione nel citoplasma delle cellule steroidogeniche, inoltre è evidenziabile una maggiore vascolarizzazione (Fig. 19 b). Per quanto riguarda le cellule cromaffini, si può osservare la presenza di cellule ad adrenalina nella parte più esterna del cordone dorsale; queste si presentano, inoltre, poco colorabili.

Infine è evidente una severa infiltrazione macrofagica particolarmente evidente a ridosso del cordone cromaffine dorsale (Fig. 19 b).

Nel gruppo di esemplari trattati con 17 iniezioni della miscela di NP+OP sacrificati dopo 15 giorni dall'ultima iniezione (gruppo di recupero), è stata riscontrata dal punto di vista biochimico un'inversione dell'effetto stimolatorio fino ad ora rilevato in quanto CRF, ACTH e corticosterone riducono il loro livello plasmatico (Fig. 18 a), mentre i livelli plasmatici di noradrenalina aumentano e quelli di adrenalina si riducono (Fig. 18 b).

Dal punto di vista morfologico, invece, la ghiandola adrenale presenta ancora evidenti segni di stimolazione con cordoni steroidogenici ipertrofici, una prevalenza di cellule ad adrenalina ed una ipocromia delle cellule cromaffini stesse.

Il trattamento combinato di NP+OP ha determinato un tasso di mortalità pari al 42,5% (Fig. 23).

Effetti della miscela OP+NP sulle ghiandole tiroidee di
Podarcis sicula

Gli esemplari trattati con la miscela di octilfenolo e nonilfenolo risultano caratterizzati da una ghiandola tiroidea inibita nella sua attività secretiva come rilevato dai dati biochimici e morfologici dei vari gruppi di trattamento (Fig. 20).

Precisamente nel gruppo di esemplari sacrificati dopo 10 iniezioni di NP+OP, i livelli plasmatici del fattore ipotalamico TRH hanno subito un incremento ($9,23 \pm 0,46 \mu\text{U/ml}$) rispetto ai valori di controllo ($3,15 \pm 0,16 \mu\text{U/ml}$), mentre i livelli plasmatici dell'ormone ipofisario TSH ($1,41 \pm 0,07 \mu\text{U/ml}$) e degli ormoni T_3 ($1,01 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$) e T_4 ($0,98 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$) risultano ridotti rispetto ai valori registrati nel gruppo di controllo (gruppo di controllo= TSH: $7,23 \pm 0,36 \mu\text{U/ml}$; T_3 : $5,21 \pm 0,26 \text{ ng/ml}$; T_4 : $6,18 \pm 0,31 \text{ ng/ml}$) (Figg. 21 a-b).

L'analisi morfologica della ghiandola tiroidea in accordo con i risultati relativi ai livelli ormonali ha evidenziato una leggera riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare ed una parziale retroazione della colloide (Fig. 22 a).

Tale inibizione è maggiormente accentuata negli esemplari trattati con 17 iniezioni della miscela di NP e OP (Fig. 22 b).

Gli esemplari trattati con 17 iniezioni della miscela di NP+OP, sacrificati 15 giorni dopo l'ultima iniezione, sono caratterizzati da una riduzione dei livelli plasmatici di TRH ed un incremento dei valori di TSH, T_3 e T_4 , tali dati biochimici sono però di gran lunga lontani da quelli registrati negli esemplari di controllo (Figg. 21 a-b), l'analisi morfologica invece non evidenzia alcun segnale di ripresa dell'organismo.

VII CAPITOLO

DISCUSSIONI

La continua introduzione nell'ambiente di diverse sostanze inquinanti, con evidenti effetti biologici e tossici indotti anche da basse concentrazioni, rende di estrema attualità ed importanza il loro studio, con particolare attenzione ad un gruppo di sostanze definito dall'EPA come EDC (Endocrine Disrupting Chemicals) ovvero composti chimici in grado di interferire con il sistema endocrino.

I dati riguardanti gli studi relativi agli EDC, in particolare riguardo gli alchilfenoli, sono piuttosto limitati per quel che concerne i loro effetti nei Rettili, quindi con questo studio si è cercato di verificare, attraverso un'analisi istologica e biochimica, gli effetti del nonilfenolo, dell'octilfenolo e della combinazione di tali AP (NP+OP) sulla lucertola *Podarcis sicula*.

E' stata studiata la funzionalità della ghiandola adrenale e della tiroide, due ghiandole che svolgono un ruolo molto importante nel sistema endocrino e rappresentano in genere un bersaglio per la tossicità.

Il trattamento con il nonilfenolo è stato eseguito somministrando agli esemplari di *Podarcis* NP in due dosi

diverse: LD50/100 (Dose A) e LD50/10 (Dose B), mediante iniezioni intraperitoneali.

Dai dati ottenuti si evince un effetto stimolatorio del NP, somministrato in entrambe le dosi (sull'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale); tale stimolazione è dose- e tempo-dipendente.

Infatti i valori di CRF, ACTH e corticosterone aumentano in seguito al trattamento. L'aumento contemporaneo di tutti e tre i membri dell'asse ipotalamo (CRF)-ipofisi (ACTH)-ghiandola adrenale (corticosterone) suggerisce che il NP possa inibire i meccanismi di feedback negativo che normalmente regolano tale asse, determinando una secrezione continua del fattore ipotalamico CRF con una conseguente continua stimolazione dell'intero asse.

Inoltre, l'aumento di corticosterone, riscontrato già negli esemplari trattati con 24 iniezioni di LD50/100 e accentuato negli esemplari trattati con 38 iniezioni (LD50/100), è accompagnato da un netto incremento dei livelli plasmatici di adrenalina e contemporaneamente, da una forte diminuzione della noradrenalina. E' stato dimostrato, infatti, che i corticosteroidi sono in grado di influenzare positivamente l'attività dell'enzima Feniletanolammina-N-metiltrasferasi (PNMT), responsabile della metilazione della noradrenalina con

conseguente formazione dell'adrenalina (Laforgia et al 1997).

I dati biochimici e morfologici relativi alle catecolamine, però, possono essere dovuti anche ad un'azione diretta del NP sulle cellule cromaffini. Infatti, in letteratura è stato dimostrato, mediante studi *in vitro* su cellule cromaffini adrenali (Liu et al. 2007), che il nonilfenolo aumenta la secrezione basale di adrenalina in maniera dose-dipendente.

L'effetto stimolatorio determinato dal nonilfenolo sulla ghiandola adrenale ha provocato uno stato di stress della ghiandola stessa che infatti appare caratterizzata dalla presenza di una marcata infiltrazione macrofagica evidenziabile soprattutto a ridosso della capsula connettivale che circonda la ghiandola; tale infiltrazione macrofagica è indice di uno stato infiammatorio particolarmente accentuato ad indicare, probabilmente, una risposta dell'animale ad una situazione non fisiologica.

Mentre sull'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale il trattamento con NP ha determinato come visto un'azione stimolatoria, sull'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola tiroidea ha invece avuto un effetto inibitorio, con una particolare diminuzione dell'ormone ipofisario TSH e degli ormoni tiroidei T₃ e di T₄; tale inibizione è tempo-dipendente e

dose-dipendente. Un altro dato molto significativo è la riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare e la retrazione della colloide, in quanto è la riprova del fatto che il nonilfenolo ha la capacità di influenzare negativamente l'attività secretiva della tiroide.

È possibile ipotizzare che tale situazione possa essere dovuta ad un blocco della secrezione a livello ipofisario indotta dal nonilfenolo.

I dati biochimici e morfologici ottenuti nella lucertola *P. sicula*, che evidenziano l'azione inibitoria del NP, sono in accordo con i risultati bibliografici. In particolare in un lavoro sugli effetti del nonilfenolo su alcuni organi del sistema endocrino di embrioni di quaglie (Razia et al. 2005), è emerso che tale EDC determina la riduzione dell'altezza delle cellule dell'epitelio cubico semplice nella tiroide .

Per approfondire lo studio sugli effetti degli AP sulle ghiandole endocrine, è stato eseguito un ulteriore studio *in vivo* utilizzando octilfenolo singolarmente ed in miscela con NP. Tali trattamenti hanno dato risultati simili al trattamento precedente: in accordo con i dati biochimici e morfologici si è evidenziato un effetto dose- e tempo-dipendente da parte di OP e della miscela NP+OP sulla ghiandola adrenale e tiroidea. In modo particolare è stata osservata un'azione stimolatoria sull'asse ipotalamo-

ipofisi-ghiandola-adrenale già ben evidente negli esemplari trattati con 12 iniezioni di OP, e parallelamente negli esemplari che hanno ricevuto 10 iniezioni di NP+OP. Tale azione stimolatoria è risultata aumentata negli esemplari che hanno ricevuto rispettivamente 22 iniezioni di OP e 17 di NP+OP.

Analogamente al trattamento *in vivo* con il solo nonilfenolo, anche i trattamenti con OP e NP+OP determinano un effetto inibitorio sulla morfo-funzionalità tiroidea, in particolar modo tale inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola tiroidea si traduce in un blocco secretivo a livello ipofisario indotto da tali AP.

Tale conclusione è emersa dall'analisi dei dati biochimici registrati che evidenziano un aumento dei livelli di TRH una diminuzione degli ormoni TSH, T_3 e T_4 nel corso del trattamento. Per verificare se gli animali sono in grado di recuperare la loro normale funzionalità endocrina una volta terminata la somministrazione, sono stati messi a punto due gruppi di recupero, ovvero esemplari trattati rispettivamente con 22 iniezioni di OP e con 17 iniezioni di NP+OP ma sacrificati 15 giorni dopo l'ultima iniezione. Il quadro biochimico e morfologico dei gruppi di recupero suggerisce che venga attuato un tentativo dell'animale di ripristinare le condizioni fisiologiche. In realtà però è stato evidenziato che si ha una fase iniziale di recupero

in quanto è necessario un periodo più lungo per raggiungere il recupero completo delle condizioni fisiologiche.

La forte tossicità di tali composti è stata evidenziata anche dall'elevato tasso di mortalità riscontrato nei trattamenti in *vivo*.

In modo particolare il trattamento con il nonilfenolo alla dose LD50/100 ha determinato un tasso di mortalità pari a 27,5 %, con la dose LD50/10 del 32,5 %, mentre il trattamento con OP del 17,5% ed infine la combinazione di NP e OP ha determinato un tasso di mortalità del 42,5 %, con il decesso di più di un gruppo di trattamento. Tali dati sono molto importanti perché indicano come tali sostanze agiscano aggressivamente sull'organismo a maggiore concentrazione e come la loro combinazione ne rafforzi l'effetto tossico.

VIII CAPITOLO

TAVOLE

TRATTAMENTO NONILFENOLO

Asse Ipotalamo – Ipofisi - Ghiandola Surrenale

	<i>CRF pg/ml</i>	<i>ACTH pg/ml</i>	<i>CORTICOSTERONE pg/ml</i>	<i>NORADRENALINA pg/ml</i>	<i>ADRENALINA pg/ml</i>
CONTROLLI Tempo 0	1,53± 0.08	6,58± 0,329	7,40± 0,37	486± 24,3	315± 15,75
NP LD50/100 6 INIEZIONI	2,18± 0.109	7,15± 0,35	8,10± 0,405	317±15,85	423± 21,15
NP LD50/100 12 INIEZIONI	3,41± 0,17	8,29± 0,41	9,16± 0,46	289± 14,45	723± 36,15
NP LD50/100 24 INIEZIONI	8,15± 0,12	9,93± 0,5	14,8± 0,74	99± 4,95	976± 48,8
NP LD50/100 38 INIEZIONI	9,01± 0,45	12,8± 0,64	21,2± 1,06	71±3,55	1215± 60,75
NP LD50/10 3 INIEZIONI	6,15±0,30	8,21±0,41	9,74±0,48	146±7,3	632±31,6
NP LD50/10 6 INIEZIONI	7,09±0,35	9,13±0,45	10,2±0,61	123±6,15	845±42,25
NP LD50/10 12 INIEZIONI	8,63±0,43	10,3±0,62	18,9±0,94	85±4,25	989±49,45
CONTROLLI Con Olio	1,70± 0,085	6,63± 0,33	7,56±0,38	512±25,6	346±17,3

Figura 2: Tabella dei valori plasmatici di CRF, ACTH, Corticosterone, Adrenalina e Noradrenalina in seguito a trattamento con Nonilfenolo

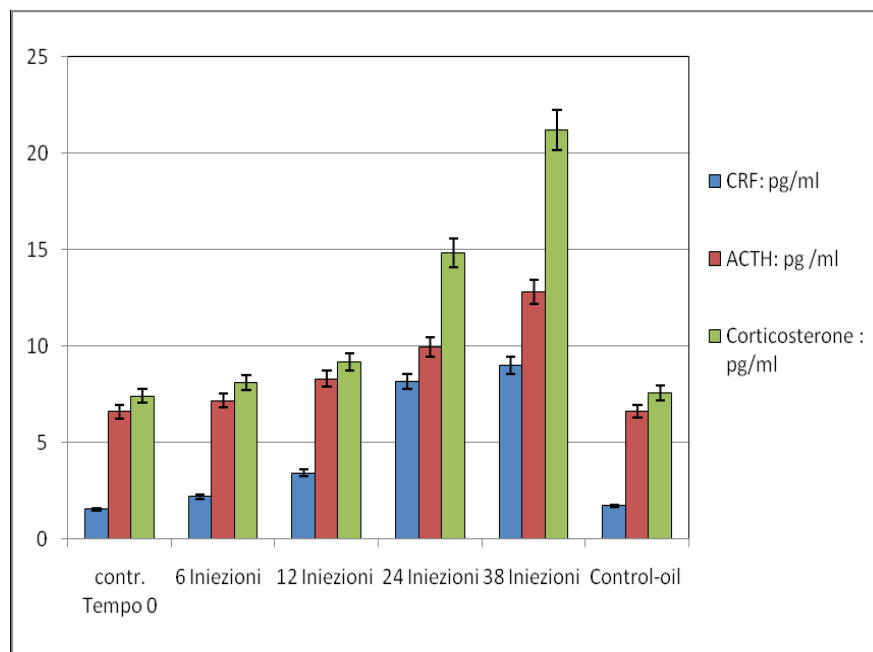


Figura 3 a: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **CRF**, **ACTH** e **Corticosterone** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/100**.

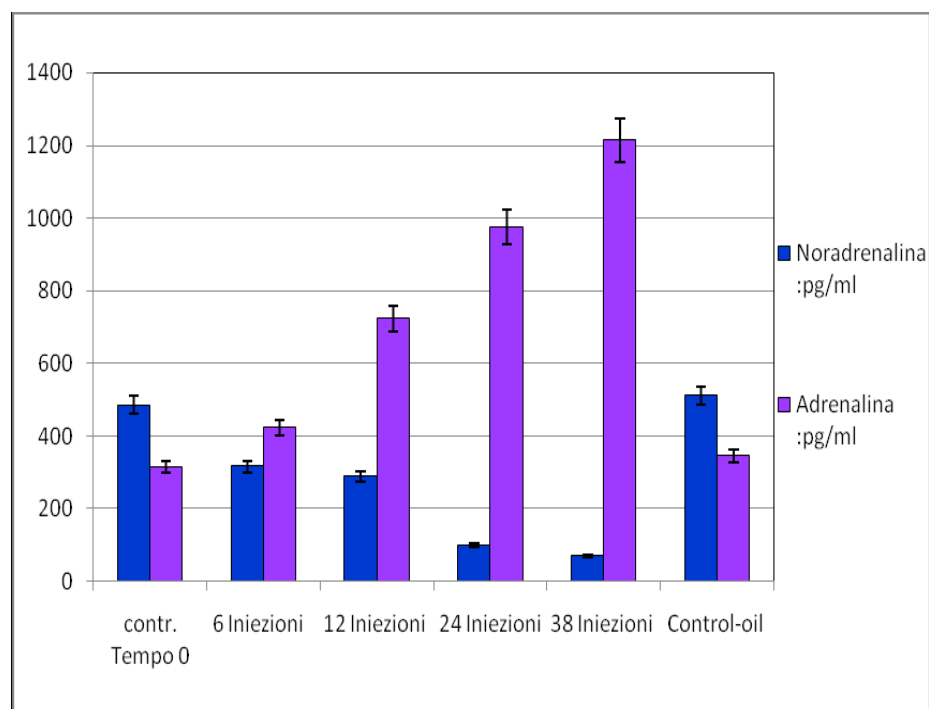


Figura 3 b: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **Noradrenalina** e **Adrenalina** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/100**.

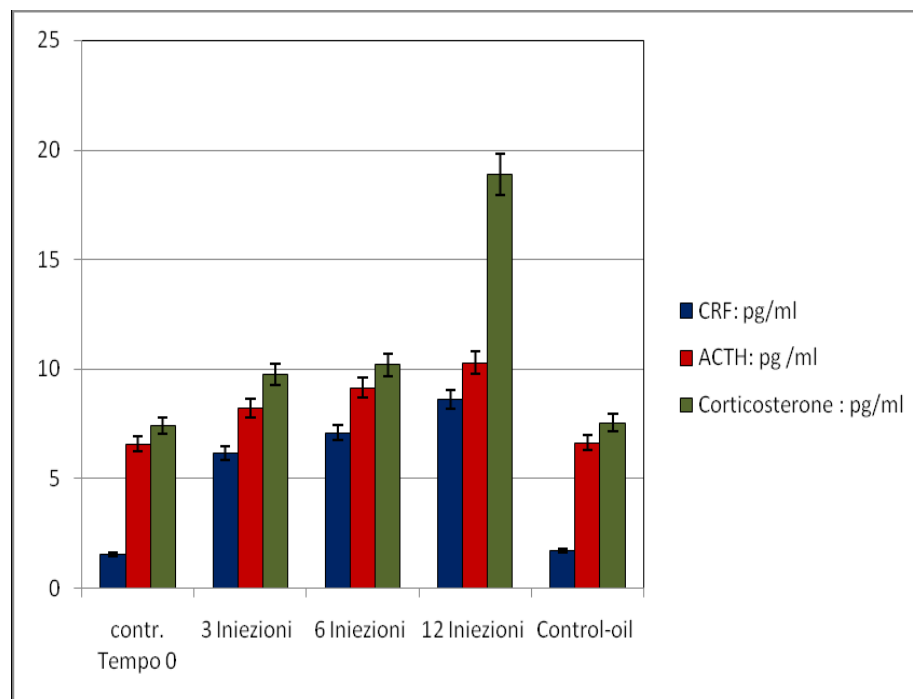


Figura 4 a: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **CRF**, **ACTH** e **Corticosterone** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/10**.

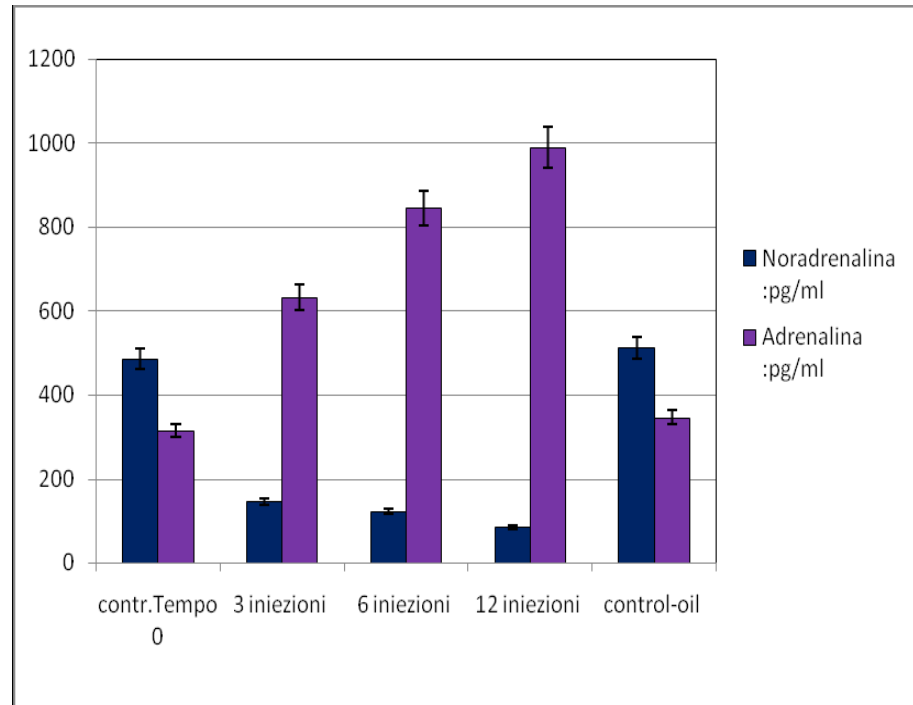


Figura 4 b: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **Noradrenalina** e **Adrenalina** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/10**.

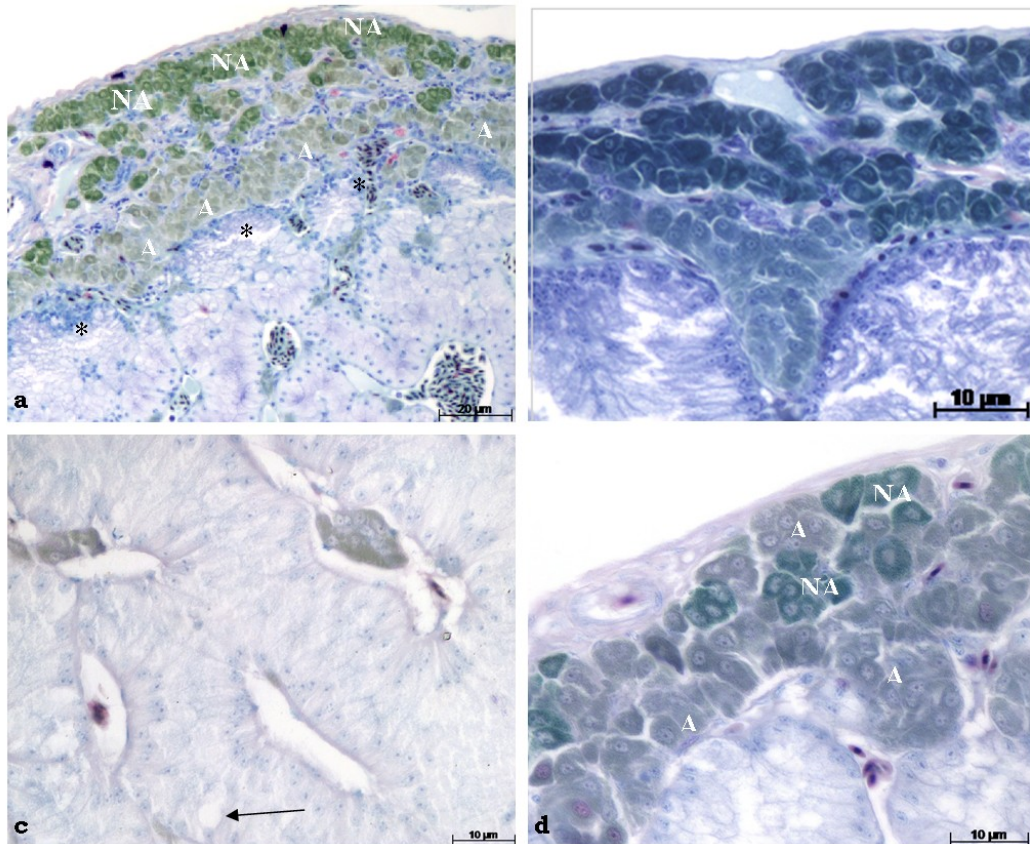


Figura 5. Ghiandola adrenale della lucertola *Podarcis sicula*:

Ghiandola del periodo estivo in cui la zona reattiva (asterischi) ed i cordoni steroidogenici appaiono poco colorati ad indicare una maggiore attività funzionale. (C. Giemsa).
(A = adrenalina; NA = noradrenalina)

Figura 5-b-. Esemplare di *Podarcis sicula* trattato con 6 iniezioni di NP-LD50/100:

Notare un aspetto simile al controllo con una normale distribuzione delle cellule a noradrenalina (NA) e ad adrenalina (A). (C. Giemsa).

Figura 5 c-d Esemplare di *Podarcis sicula* trattato con 12 iniezioni di NP-LD50/100:

Figura: c) notare una discreta vascolarizzazione della ghiandola e una maggiore vacuolizzazione a livello delle cellule steroidogeniche (freccia). (C. Giemsa)

Figura: d) il cordone cromaffine mostra un aumento delle cellule ad adrenalina (A) che iniziano a disporsi negli strati più esterni normalmente occupati dalle cellule a noradrenalina (NA). (C. Giemsa)

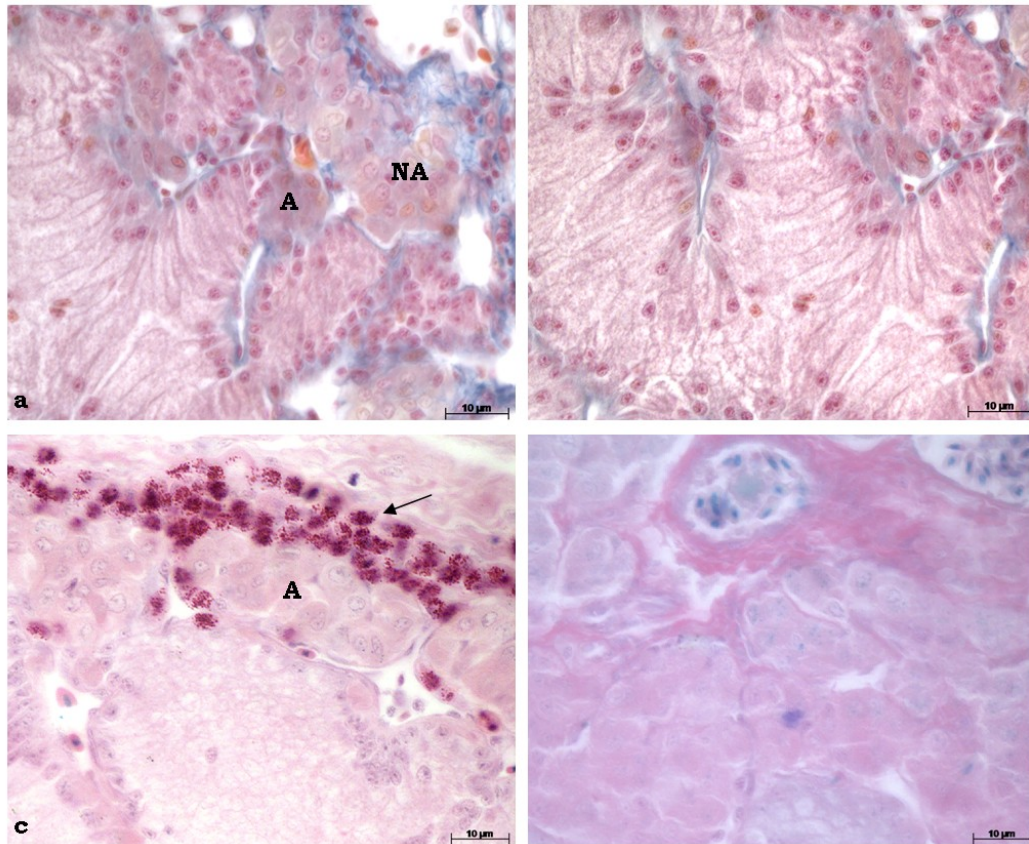


Figura 6. a-b Esemplari di *Podarcis sicula* trattati con 24 iniezioni di NP-LD50/100:

Figura a: notare lo svuotamento delle cellule cromaffini che risultano poco colorabili. (C. Galgano).

Figura b: i cordoni steroidogenici appaiono ipertrofici. (C. Galgano).

(NA= noradrenalina; A=adrenalina)

Figura 6-c. Esemplari di *Podarcis sicula* trattati con 38 iniezioni di NP-LD50/100:

Da notare l'infiltrazione macrofagica (freccia) a ridosso della capsula di tessuto connettivo che circonda la ghiandola. Si osserva anche un completo svuotamento delle cellule cromaffini che appaiono incolori (A=adrenalina). (C. Giemsa).

Figura 6-d. Esemplari di *Podarcis sicula* trattati con 12 iniezioni di NP-LD50/10:

Notare lo vuotamento delle cellule cromaffini che risultano poco colorabili (C. Giemsa).

TRATTAMENTO NONILFENOLO

Asse Ipotalamo – Ipofisi - Ghiandola Tiroidea

	TRH $\mu\text{UI/ml}$	TSH $\mu\text{UI/ml}$	T3 ng/ml	T4 ng/ml
CONTROLLI Tempo 0	2,99 \pm 0,15	5,15 \pm 0,26	4,62 \pm 0,23	5,89 \pm 0,29
NP LD50/100 6 INIEZIONI	3,15 \pm 0,16	3,26 \pm 0,16	3,15 \pm 0,16	2,46 \pm 0,12
NP LD50/100 12 INIEZIONI	5,10 \pm 0,25	3,12 \pm 0,16	2,28 \pm 0,11	3,09 \pm 0,15
NP LD50/100 24 INIEZIONI	8,90 \pm 0,44	0,98 \pm 0,04	0,90 \pm 0,04	1,00 \pm 0,05
NP LD50/100 38 INIEZIONI	9,45 \pm 0,47	0,15 \pm 0,01	0,48 \pm 0,02	0,54 \pm 0,03
NP LD50/10 3 INIEZIONI	4,22 \pm 0,21	1,43 \pm 0,07	1,56 \pm 0,08	1,03 \pm 0,05
NP LD50/10 6 INIEZIONI	8,20 \pm 0,41	1,09 \pm 0,05	1,11 \pm 0,05	1,22 \pm 0,06
NP LD50/10 12 INIEZIONI	9,11 \pm 0,45	0,73 \pm 0,04	0,66 \pm 0,03	0,79 \pm 0,04
CONTROLLI Con Olio	2,85 \pm 0,14	7,23 \pm 0,36	5,21 \pm 0,26	6,18 \pm 0,31

Figura 7: Tabella dei valori plasmatici di TRH, TSH, T₃ e T₄ in seguito a trattamento con Nonilfenolo.

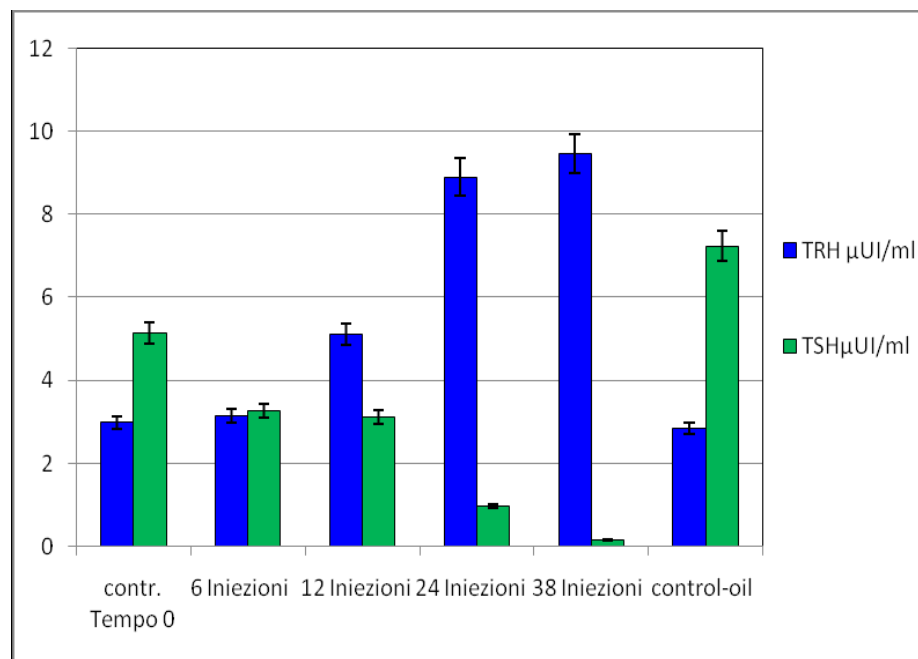


Figura 8 a: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **TRH** e **TSH** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/100**.

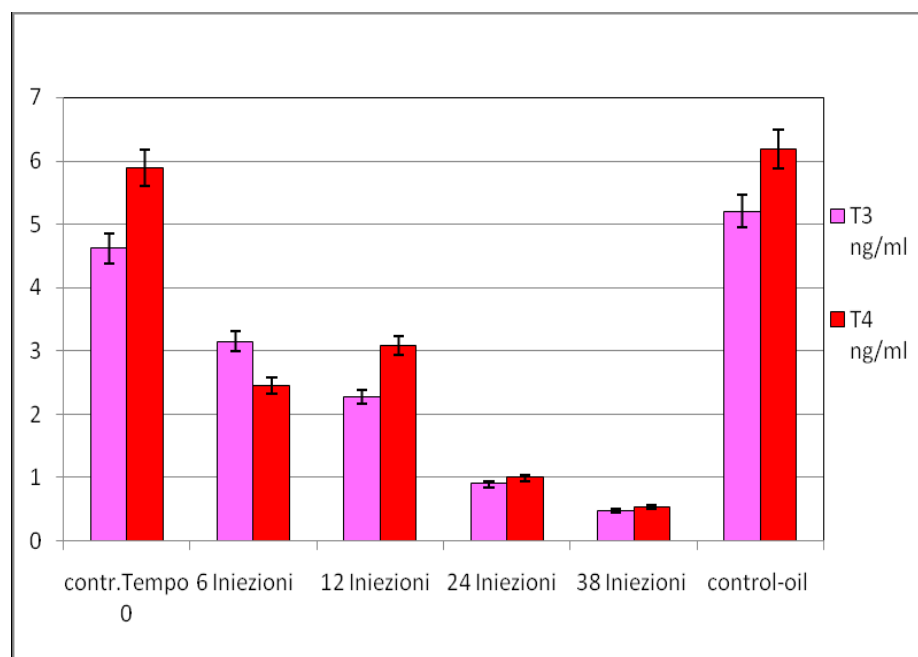


Figura 8 b : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di T_3 e T_4 in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/100**.

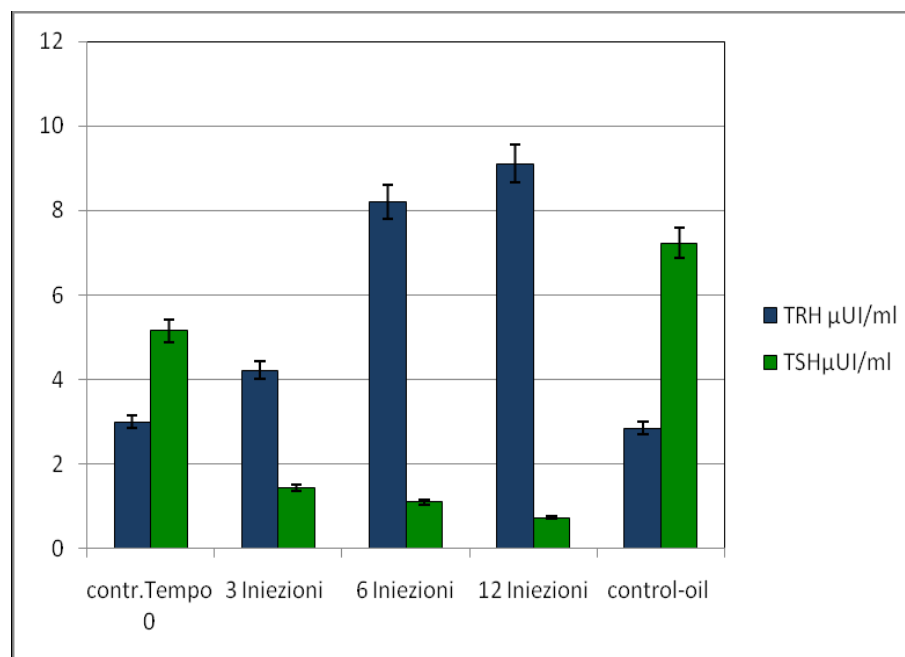


Figura 9 a: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **TRH** e di **TSH** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/10**.

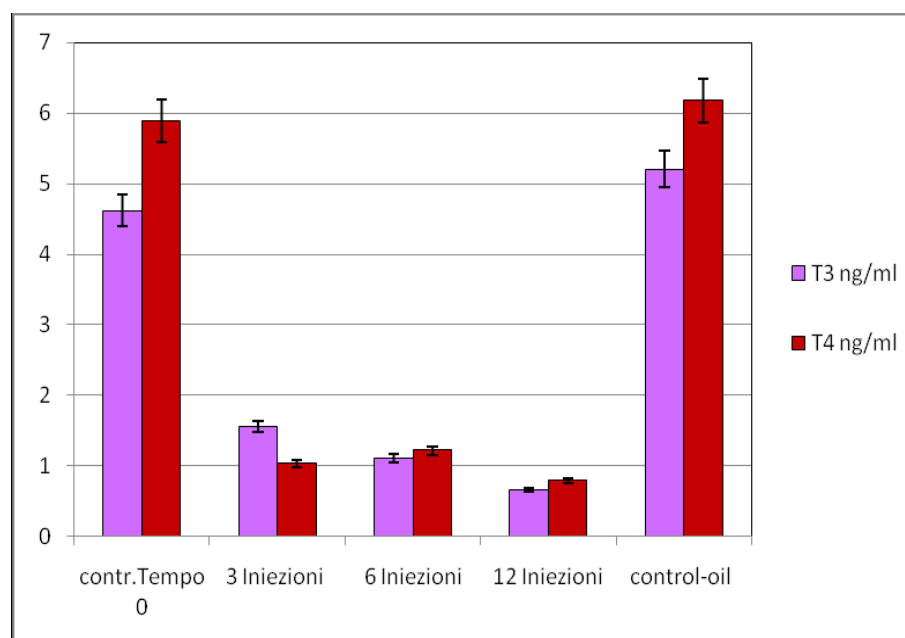


Figura 9 b : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **T₃** e **T₄** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con nonilfenolo nella dose pari a **LD50/10**.

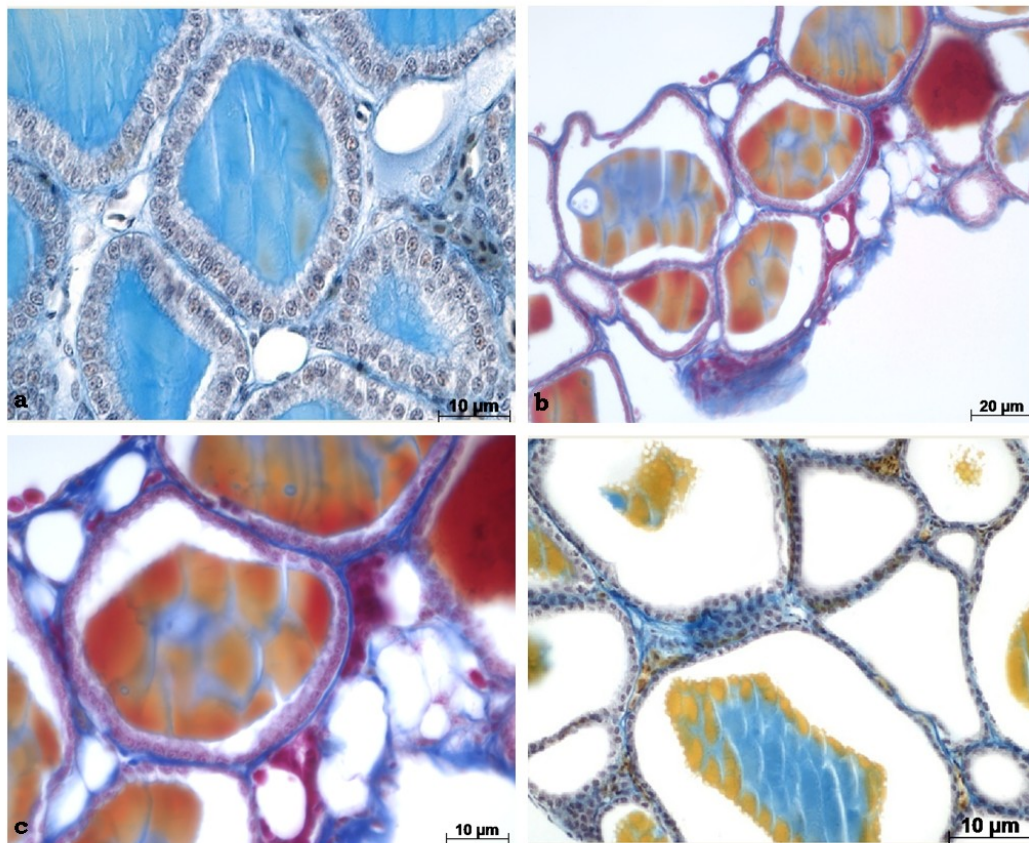


Figura 10-a. tiroide di *Podarcis sicula* controllo :

Figura a): la ghiandola tiroidea appare riccamente vascolarizzata con l'epitelio follicolare alto, i tireociti di forma cilindrica, e con la colloide intensa e in fase di attivo riassorbimento(C.Galgano)

Figura 10 b-c.- Esemplare di *Podarcis sicula* trattato con 24 iniezioni di nonilfenolo LD50/100

Figg. : b-c: notare la riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare della tiroide e forte retroazione della colloide (C. Galgano)

Figura 10 d. Esemplare di *Podarcis sicula* trattato con 38 iniezioni di NP LD50/100.

Notare una notevole riduzione dell'epitelio follicolare della tiroide che appare caratterizzata da follicoli per la maggior parte svuotati della colloide, e in quelli in cui è presente la si trova in fase fortemente retrattiva (C. Galgano)

TRATTAMENTO OCTILFENOLO
Asse Ipotalamo – Ipofisi - Ghiandola Surrenale

	<i>CRF</i> pg/ml	<i>ACTH</i> pg/ml	<i>CORTICOSTERONE</i> pg/ml	<i>NORADRENALINA</i> pg/ml	<i>ADRENALINA</i> pg/ml
CONTROLLI Tempo 0	1,53± 0.08	6,58± 0,329	7,40± 0,37	486± 24,3	315± 15,75
OP 12 INIEZIONI	9,15±0,45	11,3±0,56	14,5±0,72	117±5,85	956±47,8
OP 22 INIEZIONI	11,3±0,56	13,6±0,68	15,9±0,79	96±4,8	1023±51,15
OP 22 INIEZIONI+15 GIORNI RECUPERO	6,72±0,34	9,1±0,45	10,4±0,52	130±6,50	941±47,05
CONTROLLI con olio	2,32±0,12	6,63±0,33	7,54±0,38	512±25,6	346±17,3

Figura 11 : Tabella dei valori plasmatici d CRF , ACTH , Corticosterone , Adrenalina e Noradrenalina in seguito a trattamento con Octilfenolo.

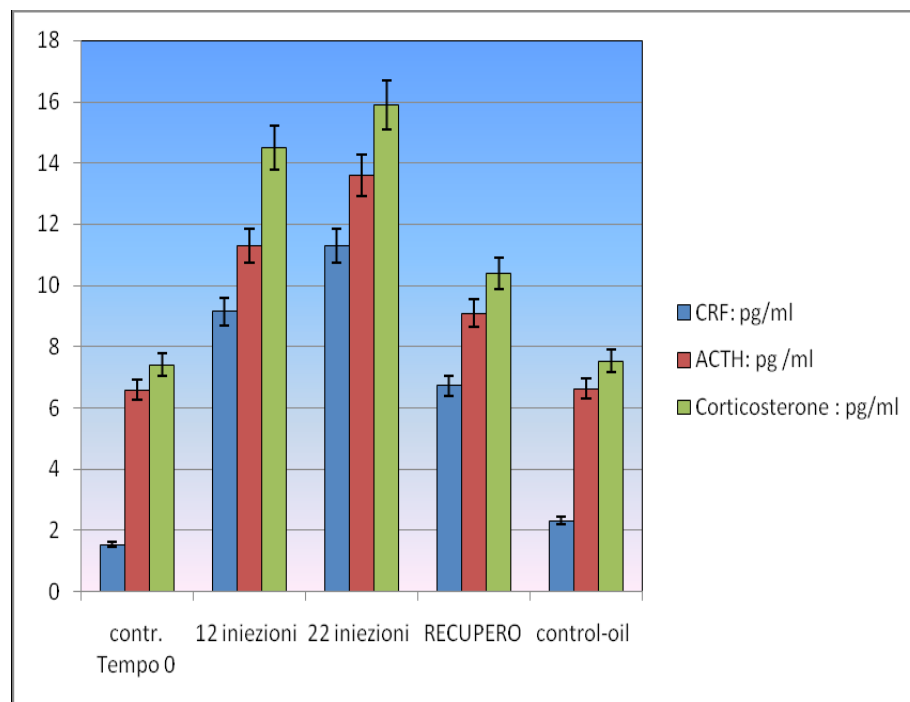


Figura 12 a: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **CRF**, **ACTH** e **Corticosterone** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo .

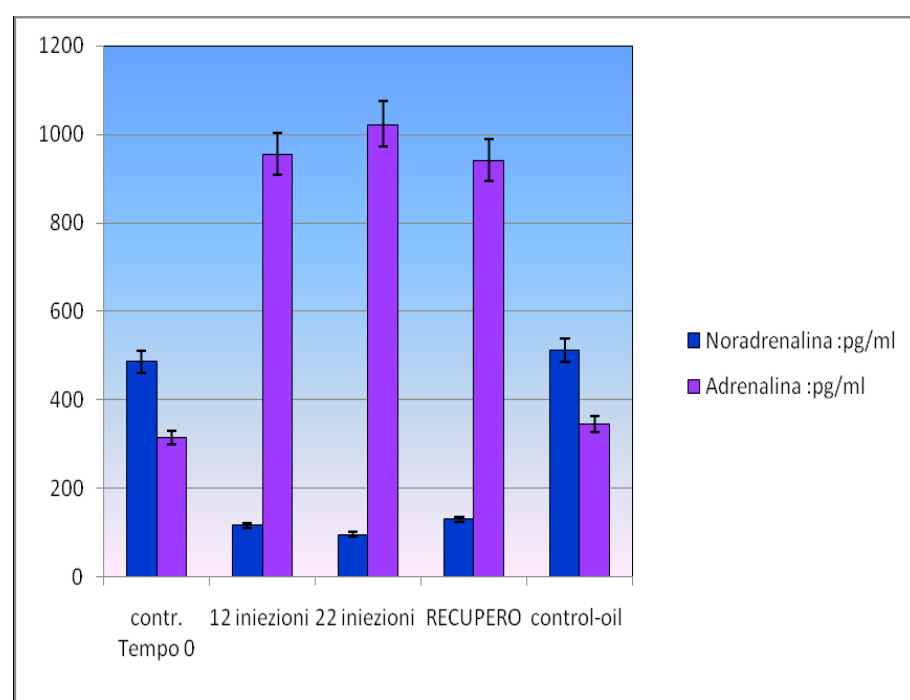


Figura 12 b : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **Noradrenalina** e **Adrenalina** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo.

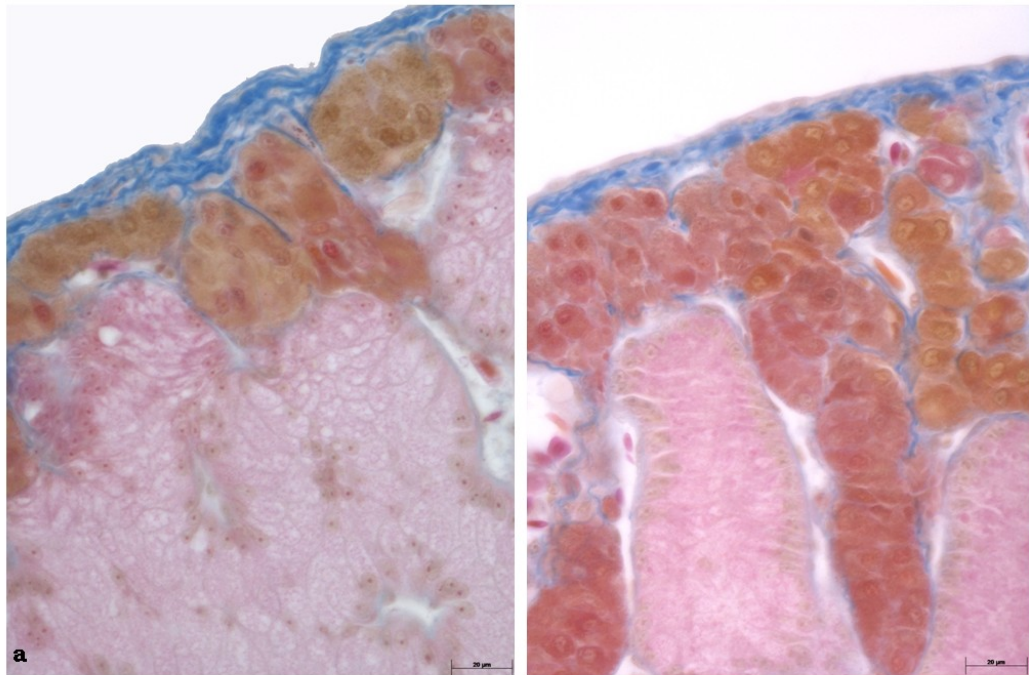


Figura 13 .Esemplari di *Podarcis sicula* trattati con OP:

Figura: 13 a- 12 iniezioni di OP:ghiandola adrenale .

Notare vascolarizzazione della ghiandola e ipertrofia dei cordoni steroidogenici(C. Galagano)

Figura: 13 b- 22 iniezioni di OP:ghiandola adrenale .

Notare ipervascolarizzazione della ghiandola e predominanza cellule ad adrenalina (C. Galagano) (

TRATTAMENTO OCTILFENOLO

Asse Ipotalamo – Ipofisi - Ghiandola Tiroidea

	<i>TRH</i> <i>μU/ml</i>	<i>TSH</i> <i>μU/ml</i>	<i>T3</i> <i>ng/ml</i>	<i>T4</i> <i>ng/ml</i>
CONTROLLI Tempo 0	2.99±0,15	5,15±0,26	4,62±0,23	5,89±0,29
OP 12 INIEZIONI	8,03±0,40	3,21±0,16	1,22±0,06	1,46±0,07
OP 22 INIEZIONI	8,48±0,42	1,98±0,10	1,00±0,05	2,43±0,12
OP 22 INIEZIONI+15 GIORNI RECUPERO	7,15±0,36	2,15±0,11	1,26±0,06	1,55±0,07
CONTROLLI con olio	3,15±0,16	7,23±0,36	5,21±0,26	6,18±,31

Figura 14 : Tabella dei valori plasmatici di TRH, TSH, T₃ e T₄ in seguito a trattamento con Octilfenolo.

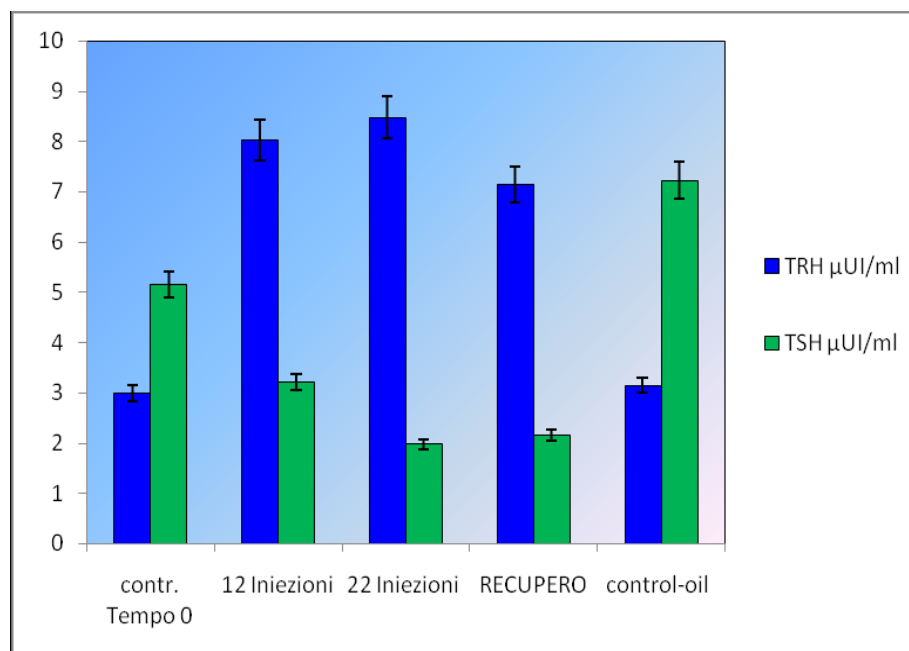


Figura 15 a : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **TRH** e di **TSH** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo.

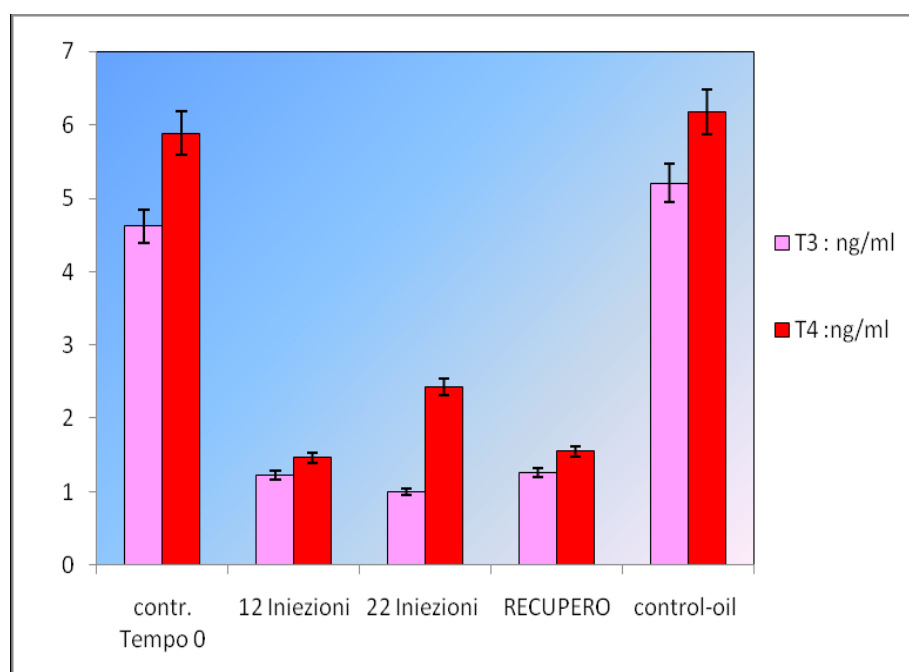


Figura 15 b : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **T₃** e **T₄** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo

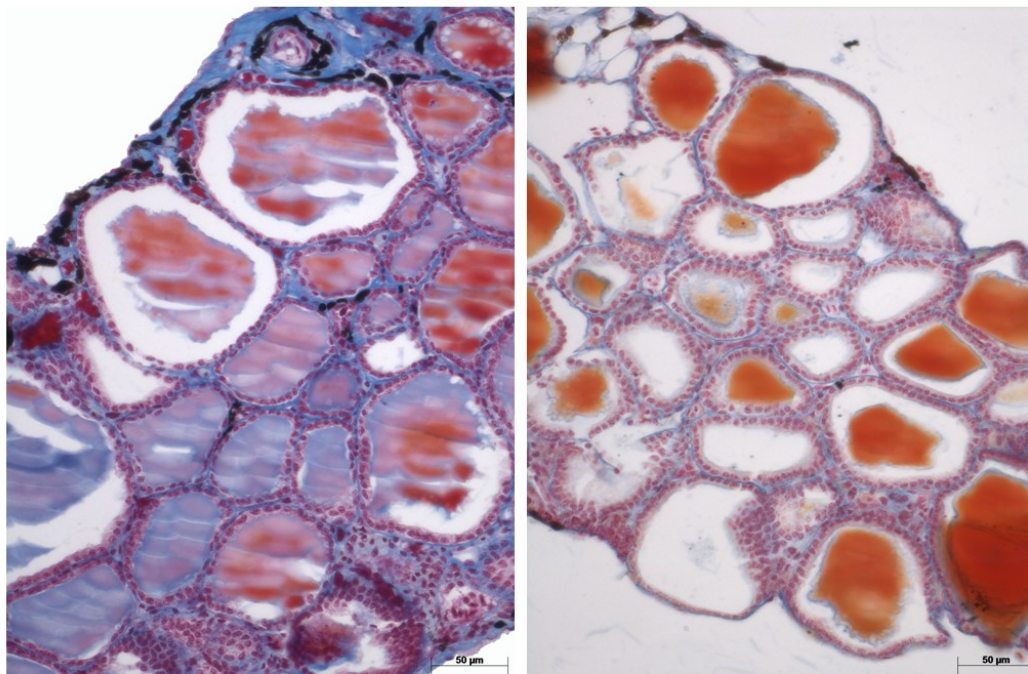


Figura 16.- Esempari di *Podarcis sicula* trattato con OP

Figura:16 a a) 12 iniezioni OP : notare la riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare della tiroide (C. Galgano).

Figura: 16 b) : 22 iniezioni OP: notare una riduzione dell'epitelio follicolare della tiroide che appare caratterizzata da alcuni follicoli svuotati della colloide, e in quelli in cui è presente la si trova in fase fortemente retrattiva (C. Galgano).

TRATTAMENTO OCTILFENOLO- NONILFENOLO

Asse Ipotalamo – Ipofisi - Ghiandola Surrenale

	<i>CRF pg/ml</i>	<i>ACTH pg/ml</i>	<i>CORTICOSTERONE pg/ml</i>	<i>NORADRENALINA pg/ml</i>	<i>ADRENALINA pg/ml</i>
CONTROLLI Tempo 0	1,53± 0,08	6,58± 0,33	7,40± 0,37	486± 24,30	315± 15,75
NP+OP 10 INIEZIONI	10,6±0,53	13,2±0,66	16,7±0,83	85±4,25	1465±73,25
NP+OP 17 INIEZIONI	13,1±0,65	16,2±0,81	18,2±0,91	72±3,6	1541±77,05
NP+OP 17 INIEZIONI+ 15 GIORNI RECUPERO	5,45±0,27	12,0±0,60	11,2±0,56	142±7,10	963±48,15
CONTROLLI con olio	2,32±0,12	6,63±0,33	7,54±0,38	512±25,6	346±17,3

Figura 17 : Tabella dei valori plasmatici d CRF , ACTH , Corticosterone , Adrenalina e Noradrenalina in seguito a trattamento con la miscela Nonilfenolo-Octilfenolo.

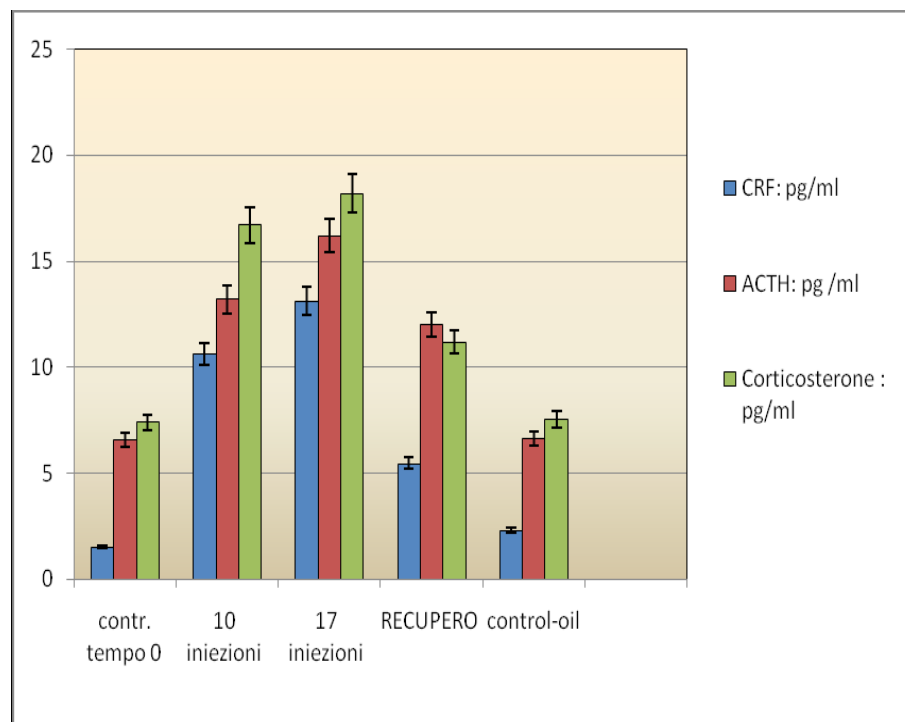


Figura 18 a : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **CRF** (corticotropin-releasing factor) **ACTH** e **Corticosterone** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo e nonilfenolo .

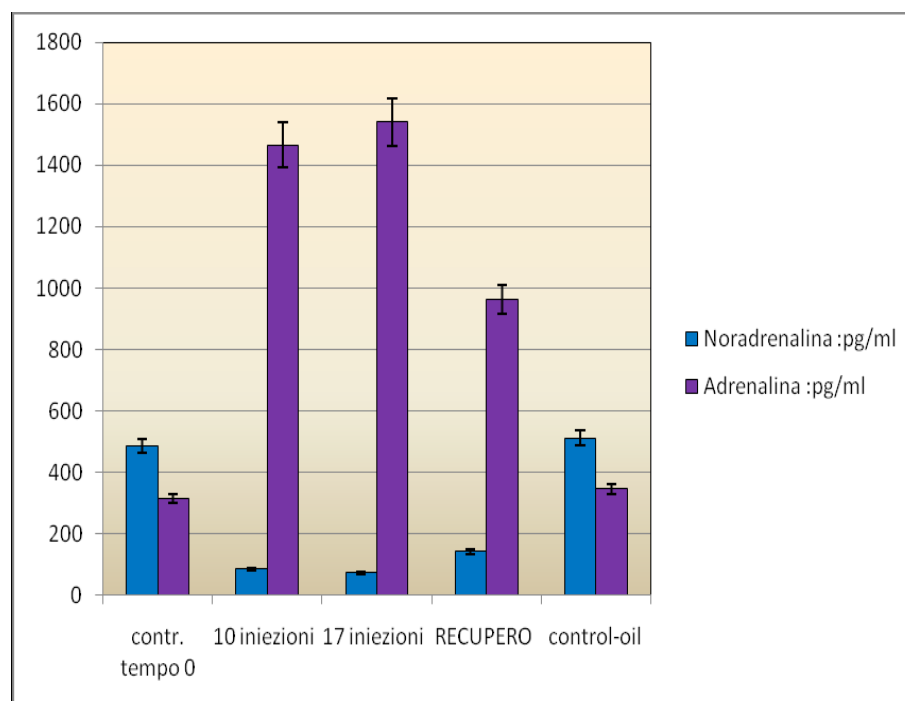


Figura 18 b : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **Noradrenalina** e **Adrenalina** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo e nonilfenolo.

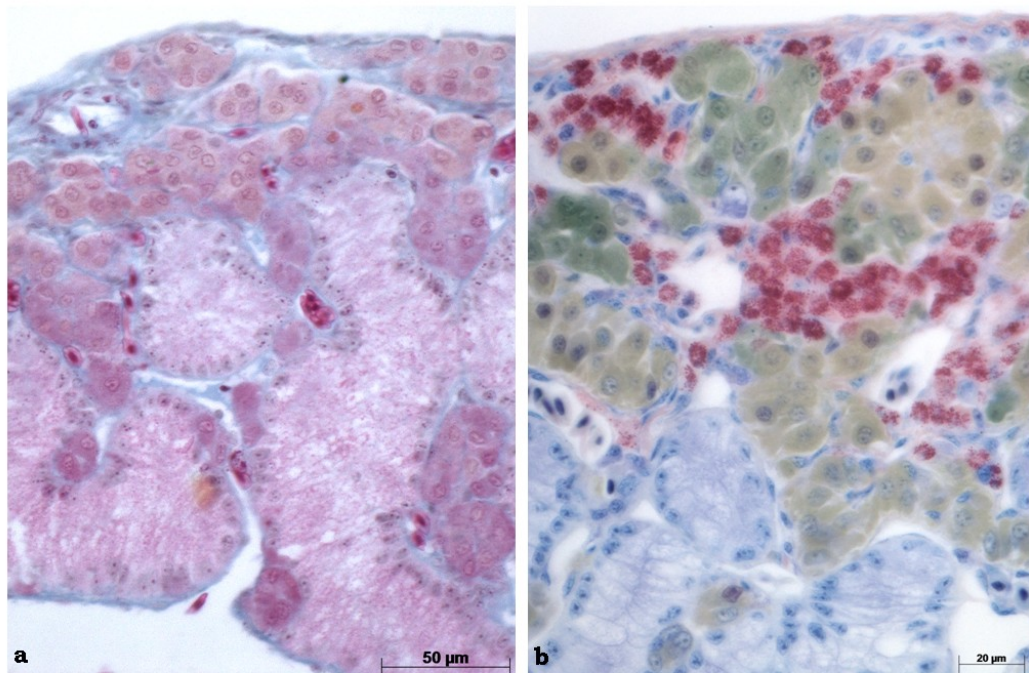


Figura 19 .Esemplari di *Podarcis sicula* trattati con iniezioni di NP+OP:

Figura. 19-a) 10 iniezioni di NP+ OP : ghiandola adrenale. Notare cordoni steroidogenici ipertrofici ed una notevole vascolarizzazione; inoltre vi è un aumento delle cellule ad adrenalina rispetto a quelle a nora-drenalina ed entrambi i tipi di cellule cromaffini appaiono poco colorabili (C. Galgano).

Figura. 19-b) 17 iniezioni di NP+ OP: ghiandola adrenale . Si può osservare la presenza di cellule ad adrenalina nella parte più esterna del cordone dorsale ed è evidente una severa infiltrazione macrofagica particolarmente evidente a ridosso del cordone cromaffine dorsale (C. Giemsa).

TRATTAMENTO NONILFENOLO+ OCTILFENOLO

Asse Ipotalamo – Ipofisi - Ghiandola Tiroidea

	<i>TRH</i> <i>μU/ml</i>	<i>TSH</i> <i>μU/ml</i>	<i>T3</i> <i>ng/ml</i>	<i>T4</i> <i>ng/ml</i>
CONTROLLI Tempo 0	2,99±0,15	5,15±0,26	4,62±0,23	5,89±0,29
NP+OP 10 INIEZIONI	9,23±0,46	1,41±0,07	1,01±0,05	0,98±0,05
NP+OP 17 INIEZIONI	10,2±0,51	1,01±0,05	0,93±0,04	0,45±0,02
NP+OP 17 INIEZIONI+15 GIORNI RECUPERO	4,15±0,21	1,63±0,08	1,15±0,06	1,36±0,07
CONTROLLI con olio	3,15±0,16	7,23±0,36	5,21±0,26	6,18±,31

Figura 20: Tabella dei valori plasmatici di TRH, TSH, T₃ e T₄ in seguito a trattamento con la miscela Nonilfenolo- Octilfenolo.

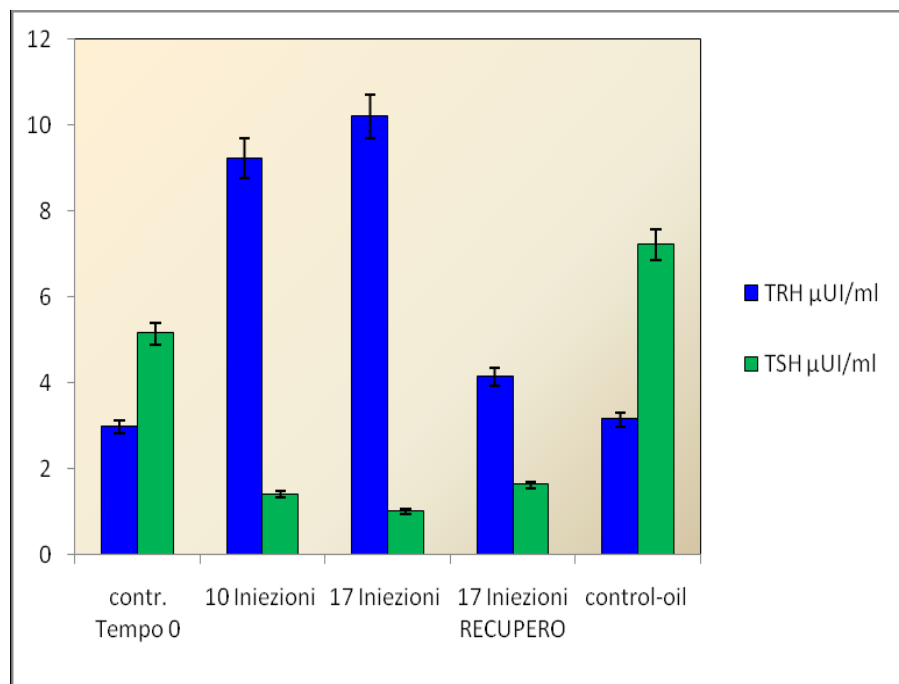


Figura 21 a : Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **TRH** e **TSH** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo e nonilfenolo.

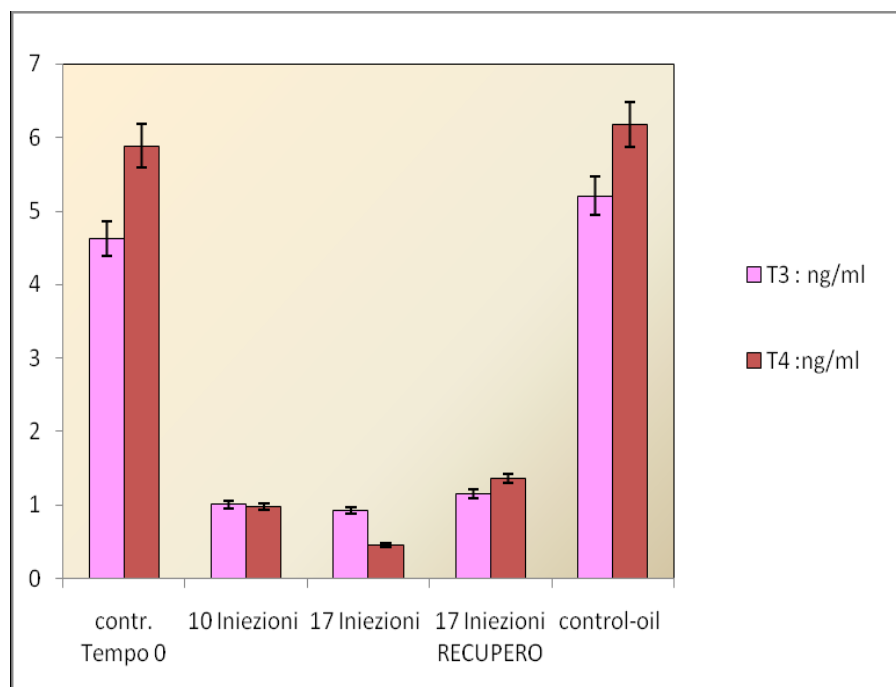


Figura 21 b: Grafico di comparazione dei livelli plasmatici di **T_3** e **T_4** in esemplari di *Podarcis sicula* controllo e trattati con octilfenolo e nonilfenolo.

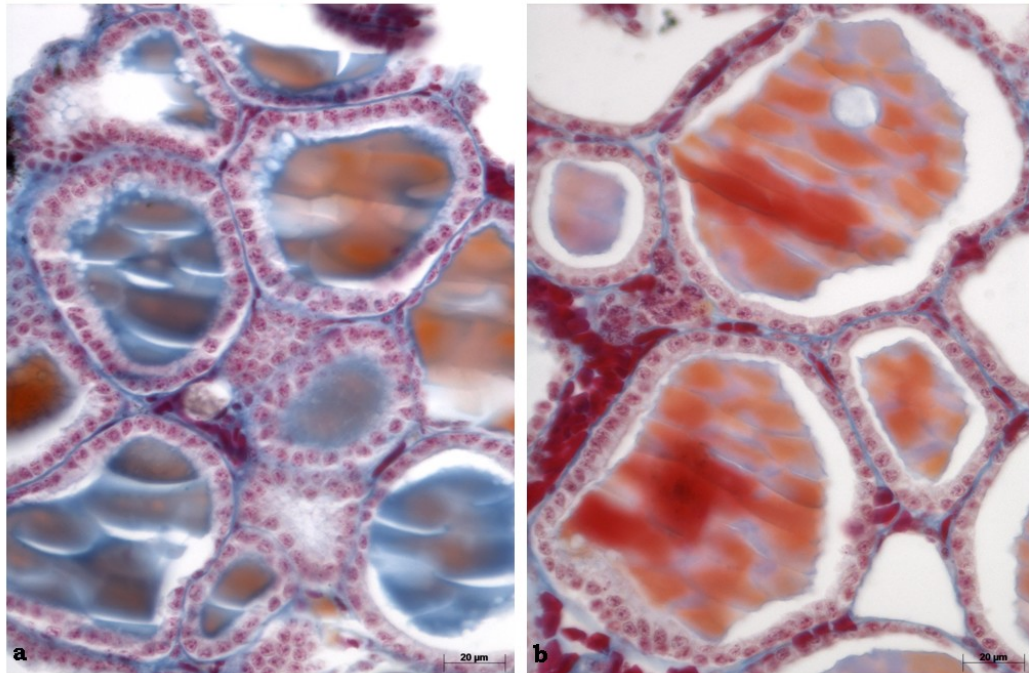


Figura 22- Esemplici di *Podarcis sicula* trattati con NP+OP.

Figura 22:-a): 10 iniezioni NP+OP : notare la riduzione dell'altezza dell'epitelio follicolare della tiroide (C. Galgano).

Fig: 22-b): 17 iniezioni NP+OP: notare una riduzione dell'epitelio follicolare della tiroide che appare caratterizzata da alcuni follicoli svuotati della colloide, e in quelli in cui è presente la si trova in fase fortemente retrattiva (C. Galgano).

Trattamento <i>in vivo</i>	Tasso di mortalità
<u>Nonilfenolo</u> LD50/100	27,5%
<u>Nonilfenolo</u> LD50/10	32,5%
<u>Octilfenolo</u> LD50/100	17,5%
<u>Nonilfenolo</u> <u>+Octilfenolo</u> LD50/100	42,5%

Figura. 23 : Tabella: Tassi di mortalità in seguito ai trattamenti in vivo con **NP**, **OP** e **NP+OP**.

IX CAPITOLO

BIBLIOGRAFIA

Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E

(2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ Int.* Oct;34(7):984-7. Epub 2008 Apr 14.

Ahel M., Hrsak D., Giger W. (1994b)."Aerobic

transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures." In: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 540-548.

Axelrod J. (1962) "Purification and properties of phenylethanolamine N-methyl transferase". *J. Biol. Chem.*, 237: 1657-1660.

Aydogan M., Korkmaz A., Barlas N., Kolankaya

D(2008). "The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats". *Toxicology* 249(35-39).

Balthazar J., Ball G. F. (1998)."New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase)". *Trends Neurosci.*, 21: 243-249.

Bartkowiak D J., Wilson W B. (1995). " Avian plasma carboxylesterase activity as a potential biomarker of

organophosphate pesticide exposure". Environ. Toxicol. Chem. 14; 2149.

Beccari- Mazzi. (1965). Manuale di tecnica microscopica. Società editrice libraria.

Bonefeld-Jorgensen, E.C., Andersen, H.R., Rasmussen, T.H., Vinggaard, A.M., (2001). Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. Toxicology 158, 141–153.

Bonefeld-Jorgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M.V., Vinggaard, A.M., (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. Environ. Health Perspect. 115 (Suppl. 1), 69–76.

Carmichael SW, Winkler H. (1985): “Le cellule cromaffini dei surreni”. Le Scienze, 206 54-65.

Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N., Wolfe G. (1999) “The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study”. Toxicol Sci;52:80-91.

Chen M.L., Chang C.C., Shen Y.J., Hung J.H., Guo B.R., Chuang H.Y., Mao I-F. (2008) “Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol”. Chemosphere 73S239-S245.

Colborn T, Clement C. (1992) “Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection.”Princeton, New Jersey: Princeton Scientific Publishing Company, Inc.; (Advances in Modern Environmental Toxicology, 21).

Cooper S., Latendresse J.R., Doerge D.R., Twaddle N.C., Xin Fu, Delclos K.B. (2006) “Dietary modulation of p-nonylphenol-induced polycystic kidneys in male Sprague-Dawley rats”.Toxicological Sciences 91(2),631-642,.

Coupland RE. (1965). “The natural history of the chromaffin cells”. Longmans, Green and Co. London

Daland R., Juberg. (1999). “An evaluation of Endocrine Modulators: Implications for Human Health”. Ecotoxicology and Environmental Safety,45: 93-105.

De Jager C., Bornman M.S., Oosthuizen J.M. (1999) “The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure”.Andrologia; 31:107-113.

Department of the Environment Report, U.K., (1993). The Formation of Bromate during Drinking Water Disinfection. DoE 3397.

**European Commission—Joint Research Centre;
Institute for Health and Consumer Protection;
European Chemicals Bureau. European Union Risk**

Assessment Report (2002) 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. Luxembourg: Office for Official Journal of the European Communities;. p. 230. EUR 20387 EN.

European Parliament; Council of the European Union. Decision 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of the 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/ 60/EC. Off J Eur Communities L 2001:1–5.

European Parliament; Council of the European Union. Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003. Off J Eur Union L 2003;178:24–7.

European Parliament; Union, C.o.t.E. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of the 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Off J Eur Communities L 2000:1–72.

Ferrara F, Fabietti F, Delise M, Piccioli Bocca A, Funari F. (2001) Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). Environ Sci Technol;35:3109–12.

Ferrara F, Ademollo N, Delise M, Fabietti F, Funari E. (2008) Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. Chemosphere. Jul;72(9):1279-85.

- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Funari, E.,** (2005). Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere* 59, 1145–1150.
- Ferreira-Leach, A.M.R., Hill, E.M.,** (2000). Bioconcentration and metabolism of 4-*tert*-octylphenol in roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Analisis* 28 (9), 789–792.
- Fossi M C, Sanchez-Hernandez J C, Diaz-Diaz R, Lari L, Garcia-Hernandez J E.** (1994). “The lizard *Gallotia galloti* as bioindicator of organophosphorus contamination in the canary Islands”. *Environ. Pollut.* 87, 289-29.
- Friedman S., Kaufman S., “3-4-dihydroxyphenylethylamine beta-hydroxylase.** (1965), Physical properties, copper content and role of copper in the catalytic activity”, *J. Biol. Chem.*, 240: 4763-4773.
- Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC** (2009). Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol Lett.* 25;189(1):67-77.
- Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T.** (2002) Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol*;36:1676–80
- Guillette L J, Gunderson jr and M P.**(2001). “Alterations in development of reproductive and endocrine

systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants”. *Reproduction* 122, 857-864.

Hall R J, Clark D R jr. (1982). “ Responses of the iguanid lizard *Anolis carolinensis* to four organophosphorus pesticides”. *Environ. Pollut. (series A)* 28; 45-52.

Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SN, Wang XY, Kang LN, Hou YY, Chen JX. (2004)“ The toxic effects of the nonylphenol on the reproductive system of male rats”. *Reprod Toxicol*;19:215-221.

Harrison PTC, Holmes P, Humfrey CDN. (1997) “Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?” *Sci Total Environ*,205:97-106.

Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen H, Larsen JJ. (2001) “In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol”*Reprod Toxicol*;15:537-543.

Inoue K., Kondo S., Yoshie Y., Kato K., Yoshimura Y., Horie M., Nakazawa H. (2001): “Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and food”. *Food Add Cont*,18(2): 157-64.

Inoue, H., Yokota, H., Makino, T., Yuasa, A., Kato, S., (2001). Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in

rat bile after liver perfusion. Drug Metabolism and Disposition 29 (8), 1084–1087.

Jobling S., Sheahan D., Osborne J., Matthiessen P., Sumpter J. (1996). “Inhibition of testicular growth in rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to oestrogenic alkylphenolic chemicals”. Environ. Toxicol. Chem., 15 : 194-202.

Jobling, S., Sheahan, D., Osbourne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to oestrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 15 (2), 194–202.

Kim IC., Lee Y.M., Lee C., Kim H.M., Oda S., Lee YS., Mitani H and Lee JS. (2006). “Expression profiles of 4-nonylphenol –exposed medaka (*Orizias latipes*)”. Analyzed with a 3.4 k microarray . Mar Environ Res. 62 Suppl: S141-6.

Kim SK, Lee HJ, Yang HW, Kim HS, Yoon YD.(2004). Prepubertal exposure to 4-tert-octylphenol induces apoptosis of testicular germ cells in adult rat. Arch Androl 50:1–15.

Kimura N., Kimura T., Suzuki M., Totsukawa K. (2006) “Effect of gestational exposure to nonylphenol on the

development and fertility of mouse offspring".
J.Reprod.Dev.52:789-795,.

Kirshneer, N., Goodall, M. (1957) "The formation of
adrenaline from noradrenaline". Biochim. Biophys. Acta,
24: 658-659;.

**Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC,
Safe SH, vander Saag PT, van der Burg B, Gustafsson
JA.** (1998). Interaction of estrogenic chemicals and
phytoestrogens with estrogen receptor Endocrinology
139:4252-4263.

Laforgia V, Muoio R. (1997). "Effects of ACTH and
corticosteroids on phenylethanolamine N-methyl
transferase (PNMT) expression as determined by
immunocytochemical localization in the adrenal gland of
the lizard *Podarcis sicula*". Ital. J. Zool., 64: 301-306;

Laforgia V, Varano L, Cavagnuolo A, Putti R. (1982).
Modificazioni nella distribuzione dei due tipi di cellule
cromaffini nella surrenale di *Podarcis sicula* Raf. dopo
somministrazione di ACTH e cortisone. Annuario Ist.
Mus. Zool. Univ. Napoli, 25: 103-112;

Laforgia V, Varano L. (1978b). " The influence of the
interrenal steroidogenic tissue on the chromaffin cells of
the adrenal gland of *Lacerta s.sicula* Raf: effects of ACTH
administration during the winter". Cell. Molec. Biol., 23:
379-390;

- Latendresse J. R., Newbold, R. R., Weis, C. C., and Delclos, K. B.**, (2001). "Polycystic kidney disease induced in F(1) Sprague-Dawley rats fed para-nonylphenol in a soy-free, casein-containing diet". *Toxicol.Sci.* 62, 140-147.
- Lee PC.** (1998) "Distruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male newborn rats". *Endocrine*; 9:105-111.
- Liu P.S., Liu G.H., Chao W.** (2008) "Effects of nonylphenol on the calcium signal and catecholamine secretion coupled with nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells". *Toxicology* 244:77-85.
- Menditto A., Caroli S., Di Domenico A. et al.** (1997). "Gli endocrine disruptors": un problema emergente nel campo della sicurezza dei composti chimici. *Not Ist Super Sanità*, 10(2):1-7.
- Michelangeli, Orłowski, S., Champeil, P., East, J.M., Lee, A. G.** (1990). "Mechanism of inhibition of the (Ca²⁺)-Mg²⁺)-ATPase by nonylphenol". *Biochemistry* 29, 3091-3101.
- Mueller GC and Kim UH.** (1978) "Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols". *Endocrinology*. 102(5):1429-35.
- Murono EP, Derk RC, de León JH.** (2000). Octylphenol inhibits.

Naylor CG. (1995)Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxilates. *Tex Chem color*;27:29-33.

Naylor, C.G., Mieure, J.P., Adams, W.J., Weeks, J.A., Castaldi, F.J., Ogle, L.D., Romano, R.R., (1992). Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (7), 695–703

Nimrod A.C., Benson W.H. (1996a)."Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates." In: *Critc. Rev. in Toxicol.*, 26 (3): 335-364.

Nukula H, Talonpoika T, Kaleva M, Toppari J.(1999). Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured mouse Leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. *Toxicol App Pharmacol* 157:166–173.

Ohta S, Ishizuka D, Nishimura H, Nakao T, Aozasa O, Shimidzu Y, et al. (2002)Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan. *Chemosphere*;46:689–96.

Paulozzi L.J., (1999)." International trends in rates of hypopadias and cryptorchidism". *Environmental Health Perspectives* 107:297-302.

Payne AH, Peakall U.K.,Walker C.H.(1994) " The role of biomarker in environmental assessment". *Exotoxicology*, 3,173-179.

Polzonetti-magni A M, Mosconi G, Palermo F, Cottone E, Forno S, Franzoni (2002). "Amphibians as model for studying xenoestrogen-dependent neuroendocrine disruption". Ital J. Zool. Suppl. 2:95-100. Regoli F.

Polzonetti-magni A M, Mosconi G, Palermo F, Cottone E, Forno S, Franzoni M F. (2004). Amphibians as model for studying xenoestrogen-dependent neuroendocrine disruption. Ital J. Zool. Suppl. 2:95-100.

Razia S, Maegawa Y, Tamotsu S, Oishi T.(2006) "Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: exposure to estrogen and nonylphenol". Ecotoxicol Environ Saf. Nov;65(3):364-71.

Regoli F. (2002). Monitoraggio della contaminazione chimica: ecotossicologica e biomarkers. Danovaro. R. (Ed), Recupero ambientale. Tecnologie, bioremediation e Biotecnologie. UTET, Torino pp 188-2. Reprod Toxicol 15:551-560

Riganti V., Baldi M., Crescenti M. (2003). "I distruttori endocrini negli alimenti e nelle acque". "Igiene dell'ambiente e del territorio".

Ron Van Der Oost, Jonny Beyer, Nico P E Vermeulen. (2002). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. and Pharmacology. 13, 57-149.

Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, Kilgore M W, Hinshelwood M M, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fischer C R, Michael M D, Mendelson C R, Bulun S E. (1994). "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis". *Endocr. Rev.* 15. 342-335.

Smith MD, Hill EM (2004).Uptake and metabolism of technical nonylphenol and its brominated analogues in the roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat Toxicol* Sep 20;69(4):359-69.

Soto A.M., Justicia H., Wray J.W. and Sonnenschein C. (1991) " p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene". *Biol Reprod* 52:217.

Wetherill, Y.B., Akingbemi, B., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcheer, S.M. (2007). *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* 24, 178–198.

White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.* Jul;135(1):175-82.

Ying GG, Williams B, Kookana R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environ Int.* Jul;28(3):215-26. Review.

Yon L, Feuillile M, Chartel N, Arimura A, Fournier A and Vaudry H. Localization, characterization and activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the frog adrenal gland. *J Endocrinol* 139: 183-194; (1993a).

Yon L, Jeandel L, Feuilloley M, Conlon JM, Arimura A, Fournier A and Vaudry H. Neuroanatomical and physiological evidence for the involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the regulation of the distal lobe of the frog pituitary. *J Neuroendocrinol* 5:289-296; (1993b).

Zhou WL, Leung PS, Wong TP, Dun NJ, Wong PYD and Chan HC. Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Endocrinology* 154: 389-395; (1997).

Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 21, 21; (2004).

Zsarnovszky, A., Le, H.H., Wang, H.S., Belcher, S.M. Ontogeny of rapid estrogen-mediated extracellular signal-

regulated kinase signaling in the rat cerebellar cortex:
potent nongenomic agonist and endocrine disrupting
activity of the xenoestrogen bisphenol A. *Endocrinology*
146, 5388–5396; (2005).